

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ APLIKAČNÍCH FOREM PRO PŘÍRODNÍ
ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KLÁRA VAJGLOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ APLIKAČNÍCH FOREM PRO PŘÍRODNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

PREPARATION AND TESTING OF APPLICATION FORMS FOR NATURAL ANTIMICROBIAL
SUBSTANCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KLÁRA VAJGLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0912/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Klára Vajglová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Petra Matoušková	

Název bakalářské práce:

Příprava a testování aplikačních forem pro přírodní antimikrobiální látky

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše k dané problematice se zaměřením na přehled antimikrobiálních látek rostlinného a živočišného původu
2. Zavedení a optimalizace potřebných metod enkapsulace, testování antimikrobiálního účinku, analýza aktivních složek
3. Experimentální studie - srovnání antimikrobiálního účinku a stability vybraných látek v různé aplikační formě.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Klára Vajglová
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt

Cílem a zaměřením této práce bylo studium antimikrobiálních a antioxidačních účinků extraktu hřebíčku, kopřivy, šalvěje, heřmánku, rozmarýnu, černého bezu, levandule a lysozymu a porovnání jejich vlivu na grampozitivní a gramnegativní bakterie. V teoretické části je stručně charakterizován lysozym, polyfenoly, flavonoidy a vybrané kmeny mikroorganismů.

V experimentální části, byly charakterizovány bylinky vykazující antimikrobiální a antioxidační účinek. Dále byly připraveny částice, u nichž byla stanovena enkapsulační účinnost, přičemž u některých bylinek bylo dosaženo účinnosti až 80 %. Stabilita připravených liposomů byla testována v modelovém trávicím procesu a po týdenní a měsíční inkubační době v modelových potravinách. Antimikrobiální aktivita se testovala na zástupcích gramnegativních i grampozitivních bakterií. Na grampozitivní bakterie spíše působily lépe čisté extrakty a liposomy s obsahem bylinek, zatímco na gramnegativní kmeny měl vyšší účinek lysozym.

Připravené antimikrobiální částice jsou vhodné pro použití zejména v potravinářském průmyslu.

Abstract

The goal of this bachelor thesis was the study of antimicrobial and antioxidant effects of some herbal extracts: cloves, nettle, sage, chamomile, rosemary, elderberry, lavender and also lysozyme. Further, herbal extracts effect on Gram positive and Gram negative bacteria were compared. In the theoretical part were briefly characterized lysozyme, polyphenols, flavonoids and selected strains of microorganisms.

In the experimental section characterization of herbs with antimicrobial and antioxidant effect was proved. Particles containing herbal extracts were prepared and encapsulation efficiency was determined. In some of tested herbs encapsulation efficiency of up to 80% was reached. Stability of the prepared liposomes was tested in the model digestive conditions and after 1 week and 1 month incubation period in model foods. Antimicrobial activity was tested on selected representatives of Gram negative and Gram positive bacteria. Gram positive bacteria were more sensitive to herbal extracts and liposomes containing encapsulated herbs, while lysozyme exhibited higher effect to Gram negative bacteria.

Prepared particles with encapsulated antimicrobial extracts are especially suitable for use in the food industry.

Klíčová slova: Antimikrobiální aktivita, bylinné extrakty, lysozym, potravinářství

Keywords: Antimicrobial activity, herbal extracts, lysozyme, food processing.

VAJGLOVÁ, K. *Příprava a testování aplikačních forem pro přírodní antimikrobiální látky*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 55 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost pracovat v jejím týmu, a hlavně Ing. Petře Matouškové za cenné rady, ochotu, pomoc a trpělivost při zpracování experimentální části.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Antimikrobiální a antioxidační látky	9
2.1.1	Lysozym	9
2.1.2	Sloučeniny fenolu.....	10
2.1.2.1	Polyfenoly.....	10
2.1.2.2	Flavonoidy	10
2.1.3	Bylinky vykazující antimikrobiální a antioxidační aktivitu	11
2.1.3.1	Kopřiva dvoudomá	11
2.1.3.2	Rozmarýn lékařský	12
2.1.3.3	Heřmánek lékařský	11
2.1.3.4	Levandule	11
2.1.3.5	Černý bez.....	12
2.1.3.6	Šalvěj lékařská.....	13
2.1.3.7	Hřebíček.....	13
2.1.4	Metody ke stanovení antimikrobiální aktivity	13
2.1.4.1	Agarová diluční metoda.....	13
2.1.4.2	Bujónová diluční metoda.....	14
2.1.4.3	Difúzní disková metoda.....	14
2.1.4.4	Agarová difúzní metoda	14
2.1.4.5	Epsilon test – E-test	14
2.1.5	Využití antimikrobiálních látek v potravinách.....	14
2.2	Enkapsulace	15
2.2.1	Liposomy.....	15
2.2.1.1	Možnosti přípravy liposomů.....	16
2.2.1.2	Aplikace liposomů v potravinářském průmyslu	16
2.2.1.3	Cholesterol.....	16
2.2.1.4	Lecitin.....	17
2.3	Možnosti charakteristiky připravovaných částic	17
2.3.1	Stanovení velikosti částic	17
2.3.2	Stanovení stability částic	18
2.4	Kultivace použitých mikroorganismů	18
2.5	Použité mikroorganismy	19

2.5.1	Gram – negativní mikroorganismy	19
2.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	19
2.5.1.2	<i>Serratia marcescens</i>	20
2.5.2	Gram – pozitivní mikroorganismy	20
2.5.2.1	<i>Bacillus subtilis</i>	20
2.5.2.2	<i>Micrococcus luteus</i>	21
3	Cíle práce	22
4	Experimentální část.....	23
4.1	Použité přístroje a chemikálie.....	23
4.1.1	Použité chemikálie	23
4.1.2	Použité přístroje a pomůcky	23
4.2	Antimikrobiální látky použité k enkapsulaci.....	24
4.3	Použité mikroorganismy.....	24
4.4	Kultivace mikroorganismů	24
4.4.1	Příprava médií pro <i>E. coli</i>	24
4.4.2	Příprava médií pro <i>B. subtilis</i>	25
4.4.3	Příprava média pro <i>M. luteus</i> a <i>S. marcescens</i>	25
4.5	Příprava bylinných extraktů.....	25
4.6	Spektrofotometrické stanovení proteinů - metoda dle Haetree – Lowryho.....	25
4.6.1	Stanovení kalibrační křivky lysozymu	26
4.7	Stanovení celkových polyfenolů	26
4.8	Stanovení celkových flavonoidů	26
4.9	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS	26
4.10	Příprava částic pomocí ultrazvuku	27
4.10.1	Příprava liposomů L1	27
4.10.2	Příprava liposomů L2	27
4.11	Stanovení enkapsulační účinnosti částic.....	27
4.12	Antimikrobiální testy	27
4.12.1	Bujónová diluční metoda	27
4.12.2	Agarová difúzní metoda	27
4.13	Stanovení stability částic v trávicích šťávách.....	27
4.13.1	Příprava žaludeční šťávy	28
4.13.2	Příprava pankreatické šťávy	28

4.13.3	Příprava žlučové šťávy	28
4.14	Stanovení stability částic v modelových potravinách.....	28
5	Výsledky a diskuze	29
5.1	Stanovení koncentrace proteinů.....	29
5.2	Stanovení celkových polyfenolů	29
5.2.1	Stanovení obsahu polyfenolů vybraných bylin v různých extraktech.....	30
5.3	Stanovení celkových flavonoidů	30
5.4	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS činidla	31
5.5	Stanovení enkapsulačních účinností	31
5.5.1	Stanovení enkapsulační účinnosti jednotlivých bylin	31
5.5.2	Stanovení enkapsulační účinnosti lysozymu.....	37
5.6	Stanovení antimikrobiální aktivity - antimikrobiální testy.....	37
5.6.1	Agarová difúzní metoda	37
5.6.2	Bujónová diluční metoda	38
5.7	Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu	41
5.8	Určení velikosti částic	41
5.9	Určení stability připravených částic	45
5.10	Stanovení stability částic v trávicích šťávách.....	46
5.11	Stanovení stability částic v modelových potravinách.....	47
6	Závěr	50
7	Seznam použitých zdrojů	52

1 Úvod

V dnešní době jsou velice často využívané přírodní antimikrobiální látky. S antimikrobiálními látkami se setkáváme velmi často v potravinářském průmyslu, ve farmacii, v kosmetickém průmyslu i v medicíně. Nejčastěji v konzervářském průmyslu, kdy je potřeba zajistit trvanlivost a zlepšit bezpečnost potravin. Zájem o zkoumání přírodních antimikrobiálních látek je zejména proto, že odolnost bakterií vůči antibiotikům stále roste.

Přírodní antimikrobiální látky inhibují růst mikroorganismů, štěpí vazby v buněčné stěně a tím činí mikroorganismy méně odolnými vůči vnějším vlivům. Nejčastější a nejznámější antimikrobiální látkou je lysozym izolovaný z vaječného bílku. Lysozym se stává jednou z nejsledovanějších antimikrobiálních látek v posledních letech. U lysozymu je velice důležitá jeho antimikrobiální aktivita, kdy dochází ke štěpení N-glykosidické vazby v buněčné stěně gramnegativních bakterií, a tím se snižuje jejich odolnost vůči vnějším vlivům.

Tato práce se zaměřuje na srovnání antimikrobiálního účinku lysozymu a několika vybraných bylinných extraktů připravených z běžně používaných bylin jako je heřmánek, kopřiva, šalvěj, rozmarýn, levandule, černý bez a hřebíček, vykazující antimikrobiální a antioxidační účinek. Antimikrobiální účinky jsou testovány pomocí dilučních a difúzních antimikrobiálních testů.

Antioxidační látky mají za úkol chránit buňky lidského organismu a napomáhat posilování imunitního systému. Polyfenoly a flavonoidy se řadí mezi antioxidanty, které samy mají i antimikrobiální efekt nebo ho podporují. Součástí práce je proto i sledování antioxidačních účinků testovaných bylinných extraktů za účelem posouzení jejich komplexního zdravotního účinku.

2 Teoretická část

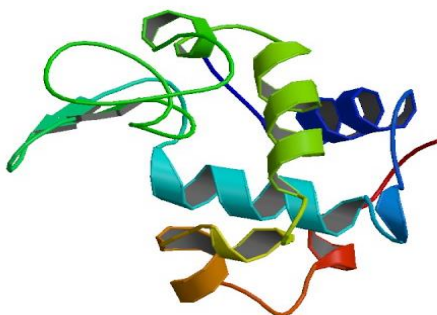
2.1 Antimikrobiální a antioxidační látky

Antimikrobiální látky jsou schopné inhibovat růst mikroorganismů. Pro určení aktivity těchto látek se uplatňuje několik metod, které jsou založeny na stejném principu.

Velký zájem je v dnešní době především o přírodní látky s antioxidačním, protizánětlivým, antibakteriálními a protinádorovými vlastnostmi. V rostlinách se vyskytují jako stavební a strukturní jednotky, které jsou zodpovědné za chuť, vůni a barvu květů a plodů. Také mají v rostlinách ochrannou funkci, před různými škůdci, mechanickým poškozením atd. Mají často strukturu fenolických látek, které na svém kruhu nesou jednu a více hydroxylovou skupinu, nebo jejich deriváty. Přijímáme je v potravinách, potravinových doplňcích i v nápojích od kávy (jeden šálek 25 - 75 mg) až po červené víno [1][2][3].

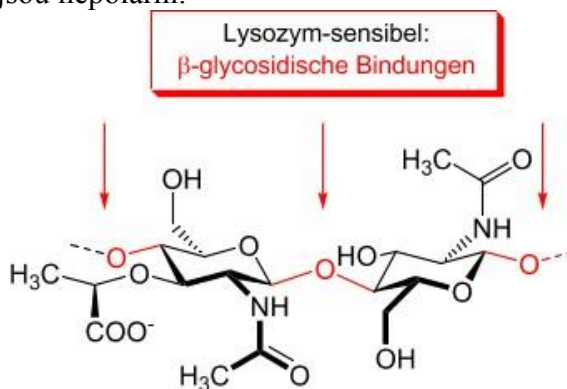
2.1.1 Lysozym

Lysozym, N-acetylmuramidglykanhydrolasa neboli muramidasa, je velice známý enzym, který se řadí do skupiny hydroláz. Je obsažen v buňkách, tělesných sekretech (sliny, slzy, krevní plazma atd.), a prakticky ve všech tkáních živých organismů a virů. Jeden z důležitých technologických zdrojů lysozymu je vaječný bílek. Nesmíme zapomenout na mléko, ve kterém je lysozym také obsažen, ale nemá přesně stejné vlastnosti jako lysozym obsažen ve vaječných bílcích.



Obrázek 1: Struktura lysozymu [4]

Lysozym je relativně malý protein. Je to jednoduchý polypeptidový řetězec, který se skládá ze 129 zbytků aminokyselin a je vnitřně síťován disulfidickými můstky. Jeho postranní řetězce uvnitř molekuly jsou nepolární.



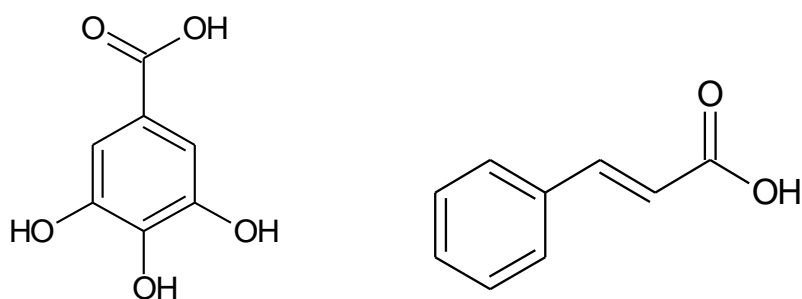
Obrázek 2: Schéma antimikrobiálního působení lysozymu [5]

Lysozym je hodně využíváný, díky své antimikrobiální aktivitě. Účinkem lysozymu dochází ke štěpení glykosidické vazby v buněčných stěnách bakterií. Buněčná stěna bakterií se rozštěpí mezi vazbou β 1-4, (C-1-*N*-acetylmuramidová kyselina a C-4-*N*-acetylglukosamin), čímž se sníží odolnost bakterie. Lysozym má i mnoho jiných funkcí, než jen antimikrobiální účinky, například inaktivuje různé druhy virů, zvyšuje aktivitu fagocytózy u polymorfonukleárních leukocytů a makrofágů, stimulací monocytů a mnoho dalších [6][3].

2.1.2 Sloučeniny fenolu

2.1.2.1 Polyfenoly

Polyfenoly jsou jednou z nejvíce se vyskytujících skupin v rostlinách. Charakterizuje je přítomnost fenolových jednotek v molekule. Obecně se dělí na hydrolyzovatelné taniny, flavonoidy a ligniny. Dělení polyfenolů je odvozeno od jednoduché polyfenolické jednotky vycházející z metabolické dráhy tzv. šikimátovou cestou. Je to nejdůležitější biosyntetická cesta, při níž vznikají fenyلكarboxylové a aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin, tryptofan). Taniny vycházejí z chemického významu kyseliny tříslové, ta je využívána pro kožedělný průmysl. Ligniny jsou spojovány s chemií půdy a rostlinných struktur [7][8].

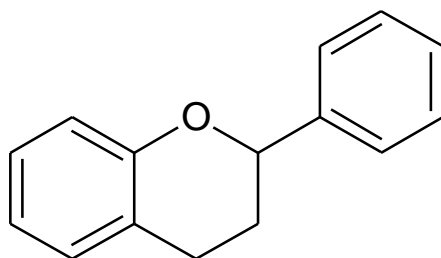


Obrázek 3: Základní jednotky taninů a ligninů - kyselina gallová a skořicová [1]

Mezi významné zdroje polyfenolů patří bobuloviny, čaj, hroznové víno, vlašské ořechy, granátová jablka, arašídý [7][8].

2.1.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou látky, které jsou téměř všudypřítomné. Nejčastěji se vyskytují v rostlinách. Nám jsou známy jako pigmenty zodpovědné například za barvení listů na podzim. Hojně se vyskytují v citrusových plodech, olivovém oleji, červeném víně a semenech [8].



Obrázek 4: Základní strukturní jednotka flavonoidů – flavon [1]

Flavonoidy vznikají acetát – malonovou cestou, při níž vzniká aromatický kruh flavanových derivátů. Jejich struktura je tvořena dvěma benzenovými kruhy, které jsou spojeny tříuhlíkatým řetězcem. Svými vlastnostmi se liší od jiných polyfenolických pigmentů, proto jsou často uváděny jako samostatná skupina rostlinných barviv [8][9].

2.1.3 Bylinky vykazující antimikrobiální a antioxidační aktivitu

2.1.3.1 Heřmánek lékařský

Heřmánek lékařský neboli *Matricaria chamomilla* je jednoletá bylina patřící do čeledi hvězdnicovitých. Pro biologické (lékařské) využití je hlavní sběr květů. Květy obsahují modré silice, jejímiž hlavní složkou je chamazulen. Dalšími složkami silic jsou bisabolol, farnesen, hořčiny, kumarinové látky, apigenin, cholin a flavonoidy. Složky silic mají významný protizánětlivý, desinfekční a hojivý účinek na pokožku. Heřmánkové silice se používají hlavně při poruchách zažívacího traktu, při onemocnění močových cest, využívá se jako prostředek k tlumení bolesti nebo při nadýmání. Chamazulen obsažený v heřmánku má protizánětlivý účinek. Toho se využívá zejména při ošetření popálenin, při poškození kůže zářením, protože chamazulen urychluje hojení, snižuje bolest a zabraňuje tvoření jizev. Flavonoidy působí protikřečově a antibakteriálně. Heřmánek se hojně využívá nejen v lékařství, ale také i v kosmetice. Silice heřmánku se přidávají do mastí, používají se k ošetření vlasové pokožky. Extrakty heřmánku se přidávají také do plet'ových masek nebo do ústních vod [10][12].

2.1.3.2 Levandule

Levandule lékařská je polokeř s latinským názvem *Lavandula angustifolia*. Patří do čeledi hluchavkovitých. Sbírají se, květy nebo celá kvetoucí nať, těsně před rozkvetem. Účinné látky levandule jsou silice, které se hromadí v trichomech květních kalichů. Hlavní složkou této silice jsou estery linalolu – terpineol, borneol, cineol a geraniol. Dalšími účinnými látkami jsou glykosidické sloučeniny, třísloviny, antokyany, hořčiny a pryskyřice. Látky levandule mají antimikrobiální účinek a jsou dobré i proti křečím žaludku a při rekonvalescenci. Levandule je používána jako mírný uklidňující prostředek a ke snížení krevního tlaku. Působí močopudně, a proti nadýmání. Levanduli lze také používat k zevnějším účelům, a to jako mast při zánětech nervů a revmatismu, nebo jako příměs do koupelí na špatně se hojící rány. Díky svým vonným prvkům mají levandulové silice hlavní význam v kosmetice a parfumerii [10][12].

2.1.3.3 Kopřiva dvoudomá

Kopřiva dvoudomá, neboli *Urtica dioica* je jednoletá bylina se žahavými chlupy. Jako zdroj účinných látek se používají listy, nať, kořeny i květ. Mezi účinné látky kopřivy patří flavonoidy, karotenoidy, chlorofyl, histamin, acetylcholin, serotonin, glukoniny, minerální látky, fytoncidy, vitaminy a další látky [11][12].

Použití kopřivy je velice rozmanité. Chlorofyl povzbuzuje funkci metabolismu, působí proti chudokrevnosti, proti revmatismu, protizánětlivě a urychluje hojení ran. Glukoniny snižují hladinu krevního cukru. Dále se kopřiva využívá jako kardiotikum, antidiabetikum při lehčích formách cukrovky, antivirově a protiprůjmově. Kopřiva také podporuje činnost

vaječníků a slinivky, zlepšuje prokrvení vnitřních orgánů a působí močopudně. V kosmetickém průmyslu se z kopřivy připravuje deodorant a používá se hlavně kořen. Z kořene se připravuje odvar, který se používá k zamezení vypadávání vlasů. Z mladých kopřivových lístků, bohatých na vitamín C se připravuje salát nebo se přidávají do jarních polévek. Čerstvé rostlinky jsou považovány za mírně toxické. Ale sušením nebo varem se toxické látky ničí a kopřivu můžeme podávat dlouhodobě a bez jakýchkoliv obtíží [11][12].

2.1.3.4 Rozmarýn lékařský

Rozmarýn lékařský latinsky známý jako *Rosmarinus officinalis*, je výrazně aromatický polokeř, patřící do čeledi hluchavkovitých. Zdrojem účinných látek jsou listy. Rozmarýn obsahuje silice, jako jsou cineol, verbenon, borneol, kafr a limonen, dále pak rozmarýnovou, kávovou, ursulovou a chlorgenovou kyselinu, flavonoidy, hořčiny, třísloviny a další látky. Obsah látek v rozmarýnu závisí na době a místě sběru.

V léčitelství se využívá při poruchách trávicího systému a zlepšení trávení. Rozmarýn také snižuje pocit únavy, uklidňuje, působí močopudně, zvyšuje nízký tlak, zlepšuje krevní oběh. Působí protizánětlivě, a desinfekčně, hlavně při zánětech močových cest. Účinné látky rozmarýnu také snižují bolest při revmatismu. V silicích rozmarýnu jsou přítomny také silné antioxidanty, které pravděpodobně působí jako prevence při nádorových onemocněních.

Rozmarýn se také používá v kosmetickém průmyslu a v potravinářském průmyslu, jako koření nebo jako rozmarýnové víno. Dostatečné množství drceného rozmarýnu se může využít i ke konzervování masa. Pro zevní použití se používají koncentrovanější výluhy. Přidávají se do koupelí, při revmatismu a na špatně hojící se rány. Při používání rozmarýnu by nikdy nemělo dojít k překročení doporučené dávky, protože účinné látky působí velice silně a mohlo by dojít ke stavu opojení nebo ke křečím [11][12].

2.1.3.5 Černý bez

Bez černý, známý pod latinským názvem *Sambucus niger* je vytrvalý keř, patřící do čeledi zimolezovitých. Zdrojem účinné látky jsou květy i plody. Účinné látky obsažené v květech jsou flavonoidy, kyselina chlorogenová, glykosid sambunigrin, slizy a stopy tříslovin. Plody obsahují cukr sambubiósu, organické kyseliny, vitamín C, třísloviny, hořčiny, antokyanová barviva a další látky. Květy působí potopudně, močopudně, snižují horečku, a příznivě působí na krevní řečiště. Používají se také při nachlazení, klidní zanícenou sliznici a mají příznivý vliv při poruchách trávení. Plody tlumí bolest například při migrénách, při bolesti svalů, páteře nebo kloubů. Působí i proti křečím trávicího ústrojí a při nadýmání. Pomáhají proti zánětům horních cest dýchacích. K zevnímu použití se používají také listy. Používají se ve formě zábalů, například proti revmatismu. Listy mohou být použity i vnitřně jako nálev čistící krev, nebo jako součást čajů proti akné. Při užívání listů, nebo kůry je důležité dbát na to, abychom nepřekročili doporučenou dávku. Při překročení této dávky může podaný bezový list vyvolat zvracení, nechutenství, celkovou slabost a průjemy. Stejně příznaky mohou být způsobeny také předávkováním bezovými plody.

Bez černý se používá nejen v léčitelství, ale také v potravinářství. Připravují se z něho bezinková vína, povidla, šňávky a likéry. Slouží také jako přírodní barvivo vín a jiných potravinářských produktů [11][12].

2.1.3.6 Šalvěj lékařská

Latinsky *Salvia officinalis* patří do čeledi hluchavkovitých. Šalvěj lékařská je polokeř s bohatě rozvětvenými větvemi ve spodní části zdřevnatělými. Účinnou látkou šalvěje jsou její silice, které se získávají z listů. Hlavní látkou silic je thujon, dalšími látkami v šalvějových silicích jsou cineol, borneol, salviol, třísloviny, hořčiny, vitamíny řady B, kafr, lakton salvin, saponiny, pryskyřice a flavony. Použití šalvějových silic je velmi různorodé. Uplatňují se nejen ve farmacii, ale také v potravinářství, kosmetice a v parfumerii. Silice šalvěje mají protizánětlivý, antibakteriální a hojivý účinek. Snižují pocení, mají mírně močopudné účinky, snižují sekreci žláz a bolesti na začátku menstruace.

Antibiotické účinky šalvěje se využívají při léčbě zánětů močových cest, při zánětech nebo poranění dutiny ústní. Využívá se při ošetření špatně se hojících ran. Jako jedna z nejučinnějších forem aplikace šalvějových silic je považována šalvějová tinktura. Šalvěj není vhodná k dlouhodobému používání, protože thujon, aktivní látka nejvíce zastoupená v silicích, je poměrně toxická [11][12].

2.1.3.7 Hřebíček

Hřebíček je název pro poupata hřebíčkovce kořeného, latinsky *Caryophyllus aromaticus*. Hřebíčkovce je strom a patří do čeledi myrtovitých. Sušená poupata obsahují silice, které dodávají hřebíčku jeho pronikavou vůni a chuť. Dále pak obsahují pryskyřice, flavonoidy a třísloviny.

Hřebíček se používá k povzbuzení trávení, proti bolesti zubů a na pročištění organismu. Povzbuzuje činnost srdce a může se použít při zánětech horních cest dýchacích. Má antibakteriální, analgetickou a dezinfekční účinnost jak při vnějším tak i při vnitřním použití. Hlavní využití má hřebíček v potravinářství, ale jeho účinné látky se mohou použít i v kosmetickém průmyslu [12][13].

2.1.4 Metody ke stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita se testuje pomocí antimikrobiálních testů. Toto testování je prováděno na mikroorganismech ve vhodných kultivačních médiích a při optimálních podmínkách. Antimikrobiální testy se dělí na difúzní a diluční [14][15][16][17][18].

Diluční metody jsou založeny na stanovení nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která viditelně inhibuje růst mikroorganismů. Podstatou této metody je přidávání přesného množství testované látky do média. Diluční metoda je vhodná pro stanovení antimikrobiální aktivity jak v tekutých tak i v pevných médiích. Po zaočkování se hodnotí absence růstu mikroorganismu [14][19].

2.1.4.1 Agarová diluční metoda

Tato metoda je metodou referenční a slouží k hodnocení nových antimikrobiálních látek. Je ekonomicky náročná a pracná. Minimální inhibiční koncentrace je zjišťována v agarovém médiu, které obsahuje různě zvolené koncentrace antimikrobiální látky [15][17][18].

Standardní kultura mikroorganismů se nanáší na agarové médium. Po inkubaci hledáme nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která inhibuje růst daného kmene mikroorganismu [15][17][18].

2.1.4.2 Bujónová diluční metoda

Dříve se tato metoda prováděla v řadě zkumavek. Dnes jsou hlavně využívány mikrotitrační destičky, do kterých napipetujeme médium obsahující sestupnou koncentraci antimikrobiální látky. Do těchto látek se očkují testované kultury mikroorganismů. Po inkubaci se hodnotí minimální inhibiční koncentrace antimikrobiální látky, kde nevznikl zákal nebo sediment, který vyjadřuje růst mikroorganismu. Vyhodnocení lze provést vizuálně, turbidimetry, měřením absorpance nebo pomocí přímého stanovení počtu buněk buďto v počítacích komůrkách nebo pomocí průtokové cytometrie [15][17][18].

Druhou metodou využívanou pro stanovení antimikrobiální aktivity je metoda difuzní. Difuzní metody se používají, protože jsou jednoduché a rychlé. Principem těchto metod je difuze antimikrobiální látky ze zdroje do okolí. Touto difuzí vzniká klesající koncentrační gradient, který zabrání růstu mikroorganismů. Difúzní metody se provádějí na pevných médiích [19].

2.1.4.3 Difúzní disková metoda

Tato metoda je jednoduchá a jejím principem je difuze antimikrobiální látky z papírového disku do agarového média. Médium je naočkováno stanovenou koncentrací testovaného mikroorganismu.

Z agarového média se uvolňuje voda a rozpouští antimikrobiální látky, které jsou difúzí vpravovány do média. Kolem papírového disku vzniká koncentrační gradient účinné látky inhibující růst mikroorganismu. Touto metodou je možné zjistit i účinné koncentrace antimikrobiálních látek. V tomto případě bývají papírové disky napuštěné různými koncentracemi účinných látek [17][15][16].

2.1.4.4 Agarová difúzní metoda

Touto metodou se minimální inhibiční koncentrace určuje na stejném principu jako difúzní disková metoda. Rozdíl mezi těmito metodami je v aplikaci antimikrobiálních látek. U této metody se antimikrobiální látky pipetují přímo do vyhloubených jamek v médiu. [15][17][18]

2.1.4.5 Epsilon test – E-test

Jedná se o kvantitativní metodu, která kombinuje difúzní a diluční metody. Je podobná diskovým difúzním metodám, ale dá se u nich určit i minimální inhibiční koncentrace. Patří mezi metodu finančně náročnou a pracnou. Na agar s testovaným mikroorganismem jsou aplikovány E – testové proužky, které na svých krajích obsahují gradient antimikrobiální látky. Antimikrobiální látky prostupují do média a ovlivňuje růst mikroorganismů. Po inkubační době se vytvoří elipsoidní inhibiční zóna a hodnota minimální inhibiční koncentrace se odečte v místě, kde se prolíná okraj proužku s hranicí růstu mikroorganismu. Rozdíly ve výsledcích můžeme vidět, pokud vyměníme mikroorganismus [15].

2.1.5 Využití antimikrobiálních látek v potravinách

Antimikrobiální látky se aplikují do potravin zvláště při konzervárenských procesech a při skladování. Problém jak nejlépe ošetřit potraviny před mikroorganismy přírodními antimikrobiálními látkami je stále v řešení. V potravinářských průmyslech mnoha zemí jsou

schváleny a používány syntetické antimikrobiální látky. Trendem poslední doby je ovšem používání právě přírodních antimikrobiálních látek. Rostliny obsahují mnoho antimikrobiálně aktivních látek. Hlavní otázkou a podnětem mnoha studií je problém, jak zabezpečit antimikrobiální látku, aby neztratila svou aktivitu při aplikaci do potravin a jak se vypořádat s možným toxickým efektem rostlinného extraktu. Dalším problémem může být vliv bylinných extraktů na chuť a vůni potravinářského výrobku. Aplikace přírodních antimikrobiálních látek mají před sebou ještě řadu zkoumání, než budou považovány za bezpečné, účinné a přijatelné pro aplikaci do potravin [20][21][22].

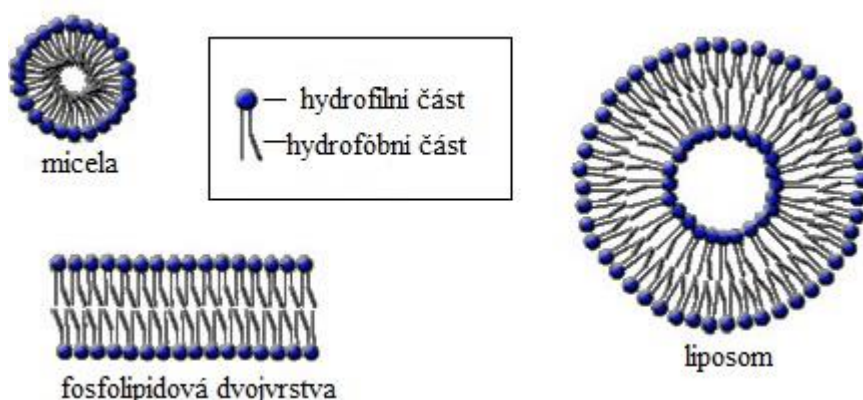
2.2 Enkapsulace

Enkapsulace je technologický proces, při kterém dochází k zapouzdření aktivní látky, jako jsou vitamíny, antioxidační látky, minerální látky nebo dokonce i probiotika, do nosného materiálu. Enkapsulací vznikají malé kapsle, pomocí kterých můžeme aktivní látky transportovat do zažívacího traktu nebo do potravin, kde se tyto látky uvolňují regulovanou rychlostí. Proto je tato metoda velmi využívána zvláště v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Enkapsulované částice mají zpravidla velikost v řádu nm, maximální velikost je udávána v μm . Materiály používané na balení aktivních látek, které jsou přidávány do potravin, jsou daleko přísněji vybírány než ty, které používá farmaceutický průmysl.

Tyto materiály musí být potravinářsky nezávadné, musí být biologicky rozložitelné a musí být schopny tvořit bariéru mezi jádrem částice a okolím. Nejpoužívanějšími materiály jsou polysacharidy, proteiny, lipidy, různé druhy rostlinných gum, jako jsou například guma karaya nebo arabská, dále pak přírodní vosky, mořské extrakty – alginát a mnohé další. Pro výběr nejvhodnějšího materiálu hraje největší roli finanční stránka [23].

2.2.1 Liposomy

Liposomy jsou uměle připravované částice, lze je připravit pomocí ultrazvuku, odpařováním na tenké vrstvě nebo za použití jiných metod. Nejčastěji jsou připravovány z lecitinu, získaného z vaječného žloutku, a cholesterolu [24][25][26].



Obrázek 5: Struktura lipozomu [27]

Membrány liposomů jsou tvořeny fosfolipidy, tato membrána obklopuje vnitřní prostor vyplněný vodným roztokem. Při přípravě liposomů dochází k vzájemnému působení hydrofilní a hydrofobní části ve vodném prostředí a tím dojde k zapouzdření. Slouží také jako modelové biologické membrány [24][25][26].

2.2.1.1 Možnosti přípravy liposomů

Ultrazvuková metoda

Metodou sonifikace lze připravit unilamelární liposomy. Existují dva postupy, kterými můžeme liposomy připravit. První metodou je sonifikace pomocí sondy, která je vhodná na malé objemy. Druhou metodou je metoda ozvučení liposomů v sonifikační vodní lázni [28][29].

Odpařování na tenké vrstvě s reverzní fází

Principem této metody je vakuové odpaření organického rozpouštědla z baňky. Na stěnách baňky se po odpaření vytvoří fosfolipidový film. Tento film se hydratuje ve vodném prostředí. Třepáním se film převede na multilamelární částici s malým enkapsulačním objemem. Pro zlepšení účinku se připravuje film v přítomnosti látky, která má být enkapsulována [29].

Sprejové sušení

Jedná se o nejrozšířenější metodu. Částice připraveny touto cestou jsou kvalitní, jak ze senzorického, tak i z texturního hlediska. Principem této metody je rychlé vysoušení pomocí horkého plynu. Nevýhodou této metody je složitost zařízení a udržení konstantních podmínek prostředí [23][30].

2.2.1.2 Aplikace liposomů v potravinářském průmyslu

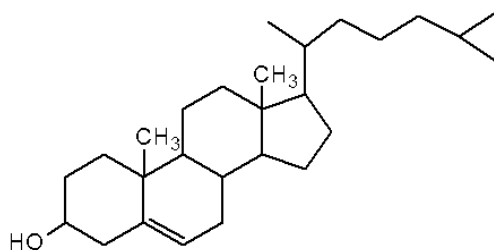
Do vnitřní části liposomů se enkapsulují aktivní látky rostlinných extraktů či léčiv. Liposomy se používají k transportu těchto látek do těla buněk a často se aplikují i do potravin. Liposomy zvyšují stabilitu aktivních látek v těle nebo v potravinách. Membrány tvořící liposomy totiž chrání aktivní látku před interakcemi mezi aktivní látkou a maticí potravin, během zpracování a skladování, a tím pádem se aktivní složka udrží zcela funkční. Pomocí liposomů se dopravují aktivní látky ve správný čas na správné místo.

Liposomy se užívají k zachování chuti a aroma, ke stabilizaci potravin a k maskování nepříjemných chutí a vůní aktivních látek přidávaných do potravin.

Nevýhodou některých typů liposomů je, že nedojde k vyloučení aktivní látky z liposomů na požadovaném místě v těle a liposomy spolu s aktivními látkami jsou vyloučeny z těla bez požadovaného účinku [23][24].

2.2.1.3 Cholesterol

Cholesterol je složka buněčných membrán, který se řadí do skupiny steroidů. Je prekurzorem pro tvorbu steroidních hormonů. Tyto hormony mají podobnou strukturu a široké spektrum životně důležitých funkcí, které řídí. Cholesterol je složen z izoprenových jednotek. Jeho syntéza i zpracování probíhá v játrech. V játrech dochází k přeměně cholesterolu na žlučové kyseliny. Jediná cesta jak lze cholesterol z těla vyloučit, je právě ve formě žlučových kyselin [31].

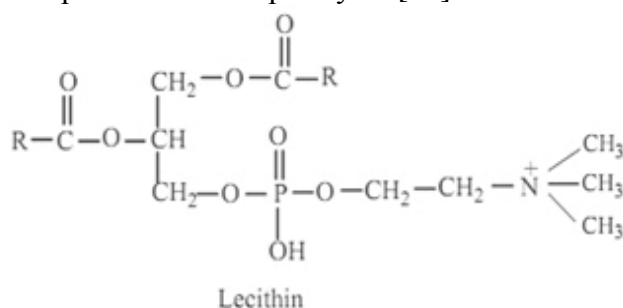


Obrázek 6: Struktura cholesterolu [32]

2.2.1.4 Lecitin

Lecitin je fosfolipidový koncentrát, který vzniká při rafinaci rostlinných olejů. Z chemického hlediska se jedná o fosfatidylcholin.

Lecitin má široké spektrum využití. Menší část lecitinu se zkrmuje a jeho větší část se používá jako emulgátor v potravinářském průmyslu [33].



Obrázek 7: Struktura lecitinu [34]

2.3 Možnosti charakterizace připravovaných částic

2.3.1 Stanovení velikosti částic

Pro určení velikosti částic se používá metoda založená na principu dynamického rozptylu světla, zkráceně DLS. Jedná se o fyzikálně – analytickou metodu. Principem této metody je měření intenzity rozptýleného světla, kterou způsobily částice v roztoku. Molekuly se v roztoku neustále pohybují neuspořádaným Brownovým pohybem. Tento pohyb způsobuje změny intenzity rozptýleného záření. Na základě změn intenzity záření lze určit velikost částice, která rozptyluje záření v roztoku. Tuto závislost definuje Stokes-Einsteinova rovnice.

Stanovování velikosti částic se provádí pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Jako zdroj světla se v těchto přístrojích používá laser. V případě, že je paprsek laseru intenzivní, používá se zeslabovač, aby nedošlo k přetížení detektoru. Většina paprsku projde přes vzorek nezměněna, jen malé množství se částicemi rozptýlí. Částice jsou schopny rozptylovat světlo do všech směrů, proto můžeme detektor umístit v jakékoli pozici. V přístroji Zetasizer Nano ZS je využívána metoda detekce zpětného rozptylu. Tato metoda snižuje množství mnohonásobného rozptylu a tím eliminuje rozptyl světla nežádoucích částic např. prachu, protože prachové částice jsou velké a rozptylují světlo pouze ve směru primárního paprsku.

V přístroji je také korelátor, který srovná intenzitu rozptylu světla v po sobě jdoucích časových intervalech. Signály z korektoru pak projdou k analýze dat [35][36][37].

2.3.2 Stanovení stability částic

Každá vrstva kapaliny okolo částice je tvořena ze dvou vrstev. První je vrstva vnitřní, nebo taky Sternova. V této vrstvě jsou ionty vázány silně. Ve druhé vnější vrstvě, neboli vrstvě difúzní, ionty takto silně navázány nejsou. Z toho vyplývá, že kolem každé částice je tvořena elektrická dvojvrstva. V difúzní vrstvě existuje hranice, uvnitř které částice a ionty tvoří stabilní jednotku. Při pohybu částice se ionty vyskytující se uvnitř hranice pohybují společně s částicí, ale ionty za hranicí se s částicí nepohybují. Stabilita částic se určuje podle potenciálu zeta. Potenciál zeta je potenciál, který existuje právě na hranici povrchu hydrodynamického smyku neboli roviny skluzu a určuje náboj na povrchu částice. Za stabilní částici je považována taková částice, která má zeta potenciál kladnější než 30 mV, nebo zápornější než – 30 mV. Pokud mají částice zeta potenciál v rozmezí od – 30 mV do 30 mV, považují se za nestabilní. Mezi částicemi s příliš malým potenciálem neexistuje síla, která by dokázala zabránit shlukování a vločkování. Zeta potenciál má mnoho faktorů, které jej mohou ovlivnit. Jedním z nejdůležitějších je hodnota pH. Zeta potenciál klesá, při zvýšení alkality roztoku. Při zvýšení kyselosti dojde buď k neutralizaci nebo ke zvýšení zeta potenciálu [2][35].

2.4 Kultivace použitých mikroorganismů

Kultivace se využívá pro umělé namnožení kultury bakterií. Kultivace se provádí na nebuněčných živných půdách. Při kultivaci je důležitý výběr správného živného média, protože nároky mikroorganismů na živná média jsou velmi variabilní. Dělí se především podle požadavků mikroorganismu na kyslík (aerobní a anaerobní) a podle požadavků na živiny. Jako rozpouštědlo se nejčastěji používá voda.

Živná média se dělí podle:

původu

1. přírodní – přírodní látky, brambory, ovoce, mléko, krevní sérum
2. syntetické – jejich chemické složení je přesně definováno, můžeme na nich studovat např. metabolismus
3. umělé – připravené, ale neznáme přesně jejich chemické složení, používá se nejčastěji v mikrobiologii

konzistence

1. pevné – jsou vhodné k izolaci čistých kultur, pro zpevnění živného média se používá agar nebo želatina. Agar je výtažek z mořských řas, který v přítomnosti vody bobtná.
2. polotuhé
3. tekuté – dobře se v nich množí bakterie, ale není vhodné pro získávání čistých kultur

obsahu živin – základní a obohacené, takové, u kterých je k základní půdě přimísen určitý extrakt

účelu použití – selektivní, universální, diagnostické a výběrové – diagnostické [38].

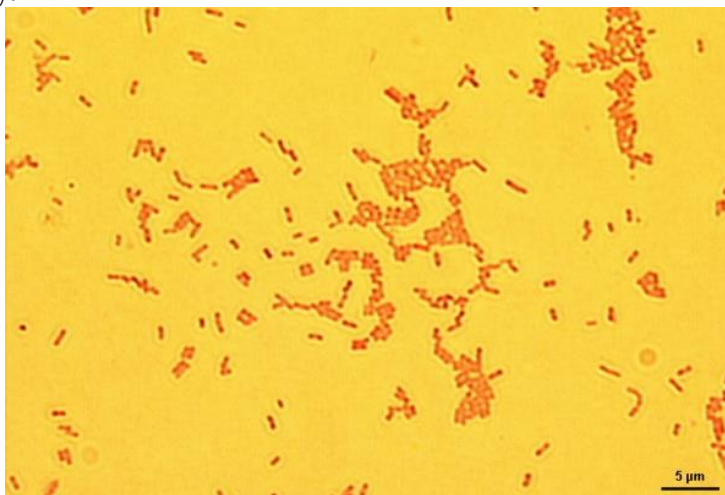
2.5 Použité mikroorganismy

Pro testování antimikrobiálních látek obsažených v námi vybraných rostlinách byly použity čtyři druhy bakterií, zastupující jak skupinu grampozitivních, tak i skupinu gramnegativních bakterií. Bakterie jsou jednobuněčné, prokaryotické mikroorganismy. Mají velice specifický metabolismus, který způsobuje jejich rychlý růst a rozmnožování. Jejich velikost je udávána v mikrometrech (μm). Pro bakteriální buňku má velký morfologický význam buněčná stěna. Buněčná stěna tvoří buňce ochranný obal před mechanickým a chemickým poškozením, vysycháním, udržuje stálý osmotický tlak v buňce a udržuje tvar buňky. Hlavní složkou buněčné stěny bakterií je peptidoglykan (murein). Struktura buněčné stěny je různá, v některých strukturách jsou mezi murein zanořeny bílkoviny, lipidy, polysacharidy nebo další jiné látky. Podle struktury buněčné stěny se bakterie dělí na grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-). Buněčná stěna grampozitivních bakterií je tvořena silnou stěnou peptidoglykanu, která je prostoupená kyselinou teichoovou. Struktura buněčné stěny grampozitivních bakterií je mnohem jednodušší než u gramnegativních. U gramnegativních bakterií je buněčná stěna tenčí, ale je daleko více složitější. Je tvořena vrstvou peptidoglykanu a nad ní je membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů a bílkovin. Tyto vrstvy jsou navzájem spojeny lipoproteiny, na horní straně membrány jsou lipopolysacharidy, které způsobují antigenní vlastnosti buňky. Mezi membránou a peptidoglykenem je periplazmatický prostor. Pro vizuální rozlišení G+ a G- bakterií se nejčastěji používá Gramovo barvení [39][40][41][42][43].

2.5.1 Gramnegativní mikroorganismy

2.5.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Je to gramnegativní, nesporotvorná, fakultativně anaerobní, tyčinkovitá bakterie. Některé druhy mohou na povrchu tvořit slizové obaly.



Obrázek 8: *Escherichia coli* - barvená dle Grama [44]

Na povrchu *E. coli* se nacházejí dva typy fimbrií. První druh je složen z hydrofobního proteinu, tzv. fimbrinu. Ten umožňuje bakterii se přichytit k epitelu hostitele. Druhý typ fimbrií je tzv. sex pili. Bakterie se může pohybovat pomocí bičíků [45].

Povrch bakterie je tvořen tenkou vrstvou peptidoglykanu. *E. coli* se řadí mezi chemoheterotrofní organismy, to znamená že je schopna využívat aminokyseliny a množství cukrů jako zdroj uhlíku. Nejrychleji však *E. coli* roste na glukóse. Optimální podmínky pro růst *E. coli* je při 37 °C a při pH v rozmezí 6-8 [45].

2.5.1.2 *Serratia marcesnes*

Rod *Serratia* patří do čeledi bakterií *Enterobacteriaceae*. *Serratia marcesnes* je důležitým členem této čeledi. *S. marcesnes* je fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, pohyblivá, saprofytická, gramnegativní bakterie, která má tvar tyček. Tyto bakterie netvoří endospory. *S. marcesnes* produkuje červeno – oranžové barvivo zvané prodigiosin [46][47].



Obrázek 9: *Serratia marcesnes* - barvená dle Grama [48]

V současné době je *S. marcesnes* pro člověka považován za patogenní. Tento mikroorganismus způsobuje infekce močového ústrojí, a je původcem nozokomálních chorob. Léčba infekcí způsobených *S. marcesnes* je velmi obtížná, protože tento mikroorganismus je rezistentní vůči většině antibiotik. Jediné účinné látky proti těmto infekcím, které jsou známy od nedávné doby, jsou aminoglykosidy (β -laktam). V potravinářském průmyslu může touto bakterií dojít ke znehodnocení drůbežího a rybího masa a jejich výrobků. Všichni členové tohoto rodu jsou schopni rozkládat bílkoviny a jejich produkty, mají tzv. proteolytickou aktivitu [46][47].

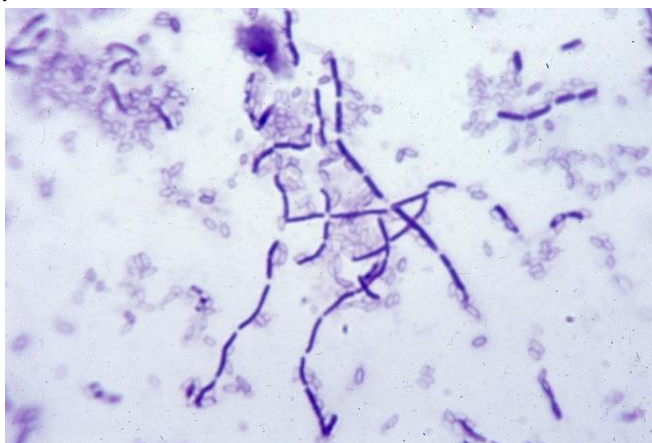
2.5.2 Grampozitivní mikroorganismy

2.5.2.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je bakterie patřící do čeledi *Bacillaceae*. Je jedním z nejlépe charakterizovaných členů ze skupiny grampozitivních bakterií. *Bacillus subtilis* je aerobní, sporulující, nepatogenní, saprofytická bakterie žijící v půdě a vodě. Má tvar tyček. Při nepříznivých podmínkách, tvoří *B. subtilis* endospory [47][49][50].

Endospory jsou klidová stádia, která dokážou snášet extrémní podmínky prostředí. Endospory mohou přežít tisíc až milion let. Buňka se zpět k životu vrací procesem zvaným germinace, neboli pučení [47][49][50].

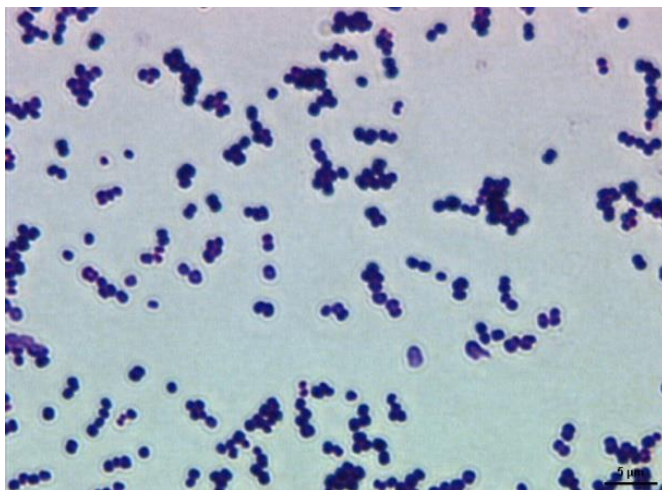
Svou schopností tvořit endospory je *B. subtilis* velmi obávaným kontaminantem v potravinách. Díky tomu, že je *B. subtilis* nepatogenní, nemá lipopolysacharidy vmezežené v membráně a je znám jeho genom, tak se používá k průmyslové produkci rekombinantních proteinů [47][49][50].



Obrázek 10: *Bacillus subtilis* - barvení dle Grama [51]

2.5.2.2 *Micrococcus luteus*

Rod *micrococcus luteus* patří do čeledi *Micrococcaceae*. Jedná se o bakterii, která je grampozitivní, aerobní, saprofytická, kokovitá bakterie. Tato bakterie je víceméně všudypřítomná, vyskytuje se ve vzduchu, v půdě nebo třeba i na lidské kůži. *M. luteus* produkuje žluté barvivo lutein ze skupiny karotenoidních barviv [47].



Obrázek 11: *Micrococcus luteus* - barveno dle Grama [44]

3 Cíle práce

Cílem této práce je testování optimální formy pro účinek antimikrobiálních látek a stabilitu přípravku zejména pro aplikaci do potravin V rámci této práce byly plněny následující úkoly:

1. Vypracování rešerše se zaměřením na přehled antimikrobiálních látek rostlinného a živočišného původu.
2. Zavedení a optimalizace potřebných metod enkapsulace, testování antimikrobiálního účinku, analýza aktivních složek.
3. Srovnání antimikrobiálního účinku a stability vybraných látek v různé aplikační formě

4 Experimentální část

4.1 Použité přístroje a chemikálie

4.1.1 Použité chemikálie

Lysozym from chicken egg white, Serva (Německo)

Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (Německo)

Agar Powder, Himedia (India)

LB médium (Luria-Berthani), Sigma-Aldrich (Německo)

Pepton, Himedia (India)

Hovězí extrakt, Difco laboratories (USA)

Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové – Sigma-Aldrich (SRN)

Pankreatin z vepřové slinivky – Sigma-Aldrich (SRN)

Pepsin z prasečí žaludeční sliznice – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina octová, 98% - Vitrum–LachNer (ČR)

Ethanol - Vitrum–LachNer (ČR)

Chloroform - Vitrum–LachNer (ČR)

Lecithin ze sóje - Serva (SRN)

Cholesterol – směs hydroxy-5-cholestenu a cholesten-3 β -olu - Serva (SRN)

2,2 – azinobis(3 – ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina)-(ABTS) - Sigma-Aldrich (SRN)

peroxodisíranem draselným - Sigma-Aldrich (SRN)

Hydrogenuhličitan sodný - Vitrum–LachNer (SRN)

Uhličitan sodný - Vitrum–LachNer (SRN)

Vinan sodno-draselný - Vitrum–LachNer (ČR)

Hydroxid sodný - Vitrum–LachNer (ČR)

Pentahydrát síranu měďnatého - Vitrum–LachNer (ČR)

Kyselina gallová - Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina citronová - Vitrum–LachNer (ČR)

Kyselina chlorovodíková, 35% - Vitrum–LachNer (ČR)

Chlorid hlinitý - Vitrum–LachNer (ČR)

Chlorid sodný - Vitrum–LachNer (ČR)

Dusitan sodný - Vitrum–LachNer (ČR)

Katechin - Sigma-Aldrich (SRN)

Hydrát síranu manganatého - Vitrum–LachNer (ČR)

4.1.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco, (Německo)

Vortex, TK3S, Kartell spa (USA)

Centrifuga, Sartorius

Magnetické míchadlo Lavat

Koloidní DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)

ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline

Ultrazvuková lázeň PS02000 (ČR)
Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (VB)

4.2 Antimikrobiální látky použité k enkapsulaci

Lysozym, kopřiva dvoudomá, rozmarýn lékařský, heřmánek lékařský, levandule, černý bez, šalvěj lékařská, hřebíček.



Obrázek 12: Bylinky použité k enkapsulaci

4.3 Použité mikroorganismy

V této práci byly v experimentální části pro testování antimikrobiální aktivity použity bakteriální kultury *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Bacillus subtilis* CCM 2794, *Esterichia coli* CCM 7395 a *Serratia marcesnes* CCM 8587, které byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.4 Kultivace mikroorganismů

Pro kultivaci byly použity bakterie zastupující skupinu grampozitivních mikroorganismů, mezi které patří *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* a gramnegativních jejichž zástupci jsou *Esterichia coli* a *Serratia marcesnes*. Tyto bakterie byly očkovány ve sterilním boxu na tuhá a kapalná média. *Bacillus subtilis* byl inkubován při 30 °C a ostatní bakterie byly inkubovány při 37 °C.

Pro kultivaci mikroorganismů bylo vždy použito 50 ml příslušného média připraveno do 100ml Erlenmayerové baňky a sterilizováno v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut.

4.4.1 Příprava médií pro *E. coli*

Jako kapalné médium bylo použito komerční LB médium připravené podle návodu na koncentraci 25 g/l. V případě přípravy tuhého média bylo dále přidáno množství agaru o koncentraci 20 g/l.

4.4.2 Příprava médií pro *B. subtilis*

Pro přípravu kapalného média bylo použito následující složení:

- 5 g/l peptonu
- 3 g/l beef extraktu
- 0,01 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

V případě přípravy tuhého média bylo dále přidáno množství agaru o koncentraci 20 g/l.

4.4.3 Příprava média pro *M. luteus* a *S. marcescens*

Pro přípravu kapalného média bylo použito následující složení:

- 5 g/l peptonu
- 3 g/l beef extraktu
- 3 g/l NaCl

V případě přípravy tuhého média bylo dále přidáno množství agaru o koncentraci 20 g/l.

4.5 Příprava bylinných extraktů

Na přípravu bylinných extraktů bylo naváženo 0,1 g sušené bylinky. Toto množství bylo zalito a louhováno ve vroucí vodě, kyselině citronové a etanolu, po dobu 15 minut.

4.6 Spektrofotometrické stanovení proteinů - metoda dle Haetree – Lowryho

Jedná se o kolorimetrické stanovení, založené na dvousložkovém činidle. Tato metoda byla mnohokrát upravena. Dnešní verze využívá tři činidla, namísto původních pěti. Dochází k intenzivnějšímu zbarvení roztoku a stanovení pracuje v širším rozsahu koncentrací. Roztoky jsou stabilnější a metoda tak méně pracná.

Do každé zkumavky bylo k 1 ml vzorku přidáno 0,9 ml HL činidla A, roztok byl promíchán a inkubován při 50 °C. Poté byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a bylo přidáno 0,1 ml HL činidla B. Roztok byl promíchán a ponechán stát 10 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byly přidány 3 ml HL činidla C, roztok byl opět promíchán a inkubován 10 minut při 50 °C.

Spektrofotometrické stanovení se provádí při vlnové délce $\lambda = 650 \text{ nm}$ proti slepému vzorku, v tomto případě destilovanou vodou.

HL činidlo A: na přípravu 100 ml činidla A bylo připraveno a smícháno následující množství chemikálií:

- 10 g uhličitanu sodného
- 1 g vínanu sodno-draselného (tetrahydrátu)
- 50 ml hydroxidu sodného o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Po rozpuštění uhličitanu a vínanu v hydroxidu byla směs doplněna na 100 ml destilovanou vodou.

HL činidlo B: na přípravu 100 ml činidla B bylo připraveno a smícháno následující množství chemikálií:

- 1 g pentahydrátu síranu měďnatého
- 2 g vínanu sodno-draselného (tetrahydrátu)
- 10 ml hydroxidu sodného o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Po rozpuštění skalice a vínanu v hydroxidu byla směs doplněna na 100 ml destilovanou vodou.

HL činidlo C: na přípravu činidla C bylo potřeba naředit komerční Folin-Ciocalteu činidlo (SERVA) s vodou v poměru 1:16 [52].

4.6.1 Stanovení kalibrační křivky lysozymu

Byl připraven zásobní roztok lysozymu o koncentraci 0,30 mg/ml. Z tohoto roztoku byla vytvořena série kalibračních standardů v rozmezí 0,03 - 0,12 mg /ml. Pro každý bod kalibrační křivky byly připraveny 3 paralelní zkumavky. Absorbance byla měřena při vlnové délce $\lambda = 650$ nm oproti slepému vzorku. Jako slepý vzorek byla použita voda.

4.7 Stanovení celkových polyfenolů

Při tomto stanovení je jako standard používána kyselina gallová. Spektrofotometricky je určována intenzita zabarvení, kdy vzorek reaguje s Follin-Ciocaltauvým činidlem.

Do zkumavek se napipetuje 1 ml 10x ředěného Follin-Ciocaltautova činidla, 1 ml vody a 50 μ l vzorku. Roztok byl promíchán a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Pak byl do zkumavky přidán 1 ml nasyceného roztoku Na_2CO_3 .

Roztok byl opět promíchán a nechán 15 minut stát při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byla měřena absorbance roztoku při $\lambda = 750$ nm oproti blanku, kdy se místo vzorku přidala voda.

Pro sestrojení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové od 0,1 do 0,7 mg/ml. A při stanovení bylo postupováno stejně jako u určení celkových polyfenolů ve vzorku. Z této závislosti byl následně sestrojen graf kalibrační závislosti.

4.8 Stanovení celkových flavonoidů

Přítomnost flavonoidů vyvolává změnu zbarvení a intenzity absorbance. Jako standard je použit 1M katechin v etanolu. Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml vody a 0,2 ml 5 % roztoku NaNO_3 . Roztok byl promíchán a nechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. K roztoku se přidá 0,2 ml 10 % AlCl_3 . Roztok se opět promíchá a nechá se 5 minut stát. Poté se k roztoku přidá 1,5 ml 5 % NaOH a 1 ml vody. Roztok se nechá 15 minut stát při laboratorní teplotě a poté se měří absorbance při $\lambda = 510$ nm oproti blanku, jímž byla destilovaná voda.

4.9 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Při našem měření byla použita metoda, kdy bylo použito činidlo ABTS^{*+} . ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kation byl získán reakcí s peroxodisíranem draselným (2,45 mM). Roztok byl ponechán ve tmě při laboratorní teplotě nejméně 12 hodin. Před použitím byl roztok ABTS^{*+} zředěn UV-VIS ethanolem na absorbanci $0,700 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm. Spektrofotometr byl vynulován na UV-VIS ethanol. Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml ABTS^{*+} činidla a 10 μ l vzorku. Po dobu 10 minu byl sledován pokles absorbance. Po 10 minutách byla měřená absorbance zaznamenána. K 1ml ABTS^{*+} bylo pipetováno také 10 μ l vody. Tato hodnota sloužila jako blank.

Kalibrační křivka byla sestavena pro standardní roztok Troloxu rozpuštěný v 60% ethanolu. Rozmezí koncentrací bylo 50-400 ng/ml. Do rovnice byla dosazována hodnota ΔA ($A_0 - A_{10}$). Hodnota antioxidační aktivity byla vyjádřena jako ekvivalent Troloxu [53].

4.10 Příprava částic pomocí ultrazvuku

K extraktu bylinek byl přidán lecitin a cholesterol v poměru 450 mg vaječného lecitinu a 50 mg cholesterolu rozpuštěno ve 20 ml vody. Pomocí ultrazvuku je připravená směs promíchávána po dobu 1 minuty.

4.10.1 Příprava liposomů L1

0,045 g lecitinu a 0,005 g cholesterolu bylo rozpuštěno v 5 ml extraktu.

4.10.2 Příprava liposomů L2

0,045 g lecitinu a 0,005 g cholesterolu bylo rozpuštěno v 1 ml chloroformu. Tento 1 ml se pak přidá do 5 ml extraktu.

4.11 Stanovení enkapsulační účinnosti částic

Připravené liposomy byly centrifugovány po dobu 5 minut při 14800 ot/min. Poté byla v supernatantu stanovena koncentrace volných polyfenolů či lysozymu. Enkapsulační účinnost byla určena z rozdílu celkové koncentrace polyfenolů (lysozymu) obsažených v roztoku před a po enkapsulaci.

4.12 Antimikrobiální testy

4.12.1 Bujónová diluční metoda

Při této metodě byl turbidimetricky sledován růst mikroorganismu na mikrotitrační destičce. Vždy k 150 μ l buněk v médiu (byly použity vždy čerstvě přeočkované buňky a pro porovnání i 24 hodinová kultura) bylo pipetováno 50 μ l antimikrobiální látky či extraktu. Jako blank byla použita kultura s přídatkem 50 μ l vody. Růst byl sledován v čase 0, 3 a 24 hod.

4.12.2 Agarová difúzní metoda

Nejprve byly připraveny agarové plotny, na které bylo zaočkováno z 24 hod. kultury vybraných MO. Po dalších 24 hodinách, kdy došlo k nárustu buněk na povrchu tuhého média byl zahájen test. Do tuhého média byly vytvořeny jamky. Do jamek bylo pipetováno 80 μ l připraveného antimikrobiálního extraktu. Jako blank byla použita voda. Po 24 hodinách byla sledována velikost inhibiční zóny vytvořené okolo jamek.

4.13 Stanovení stability částic v trávicích šťávách

Připravené částice byly k roztoku trávicí šťávy přidávány vždy v poměru 1:1. Inkubace probíhala při 37°C po dobu 20 min, v případě žaludeční a pankreatické šťávy a 40 min v případě žlučové šťávy. Po ukončení inkubace byla v roztoku změřena koncentrace celkových polyfenolů (lysozymu) uvolněných z částic působením trávicích šťáv.

4.13.1 Příprava žaludeční šťávy

Pro přípravu modelové žaludeční šťávy bylo použito 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml vody. K tomuto roztoku bylo dále přidáno 0,84 ml 35 % kyseliny chlorovodíkové. Hodnota pH vzniklého roztoku byla upravena na 0,9.

4.13.2 Příprava pankreatické šťávy

Modelová pankreatická šťáva byla připravena z 0,25 g pankreatinu, 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného toto množství bylo rozpuštěno ve 100 ml vody. Hodnota pH vzniklého roztoku bylo upraveno na 8,9.

4.13.3 Příprava žlučové šťávy

Při přípravě žlučové šťávy bylo ve 200 ml fosfátového pufru rozpuštěno 0,8 g žlučových solí.

4.14 Stanovení stability částic v modelových potravinách

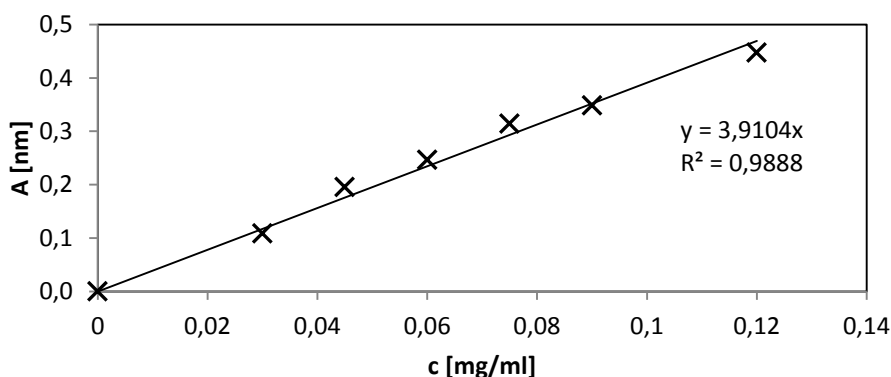
Ke zjištění stability připravených částic v potravinách byly připraveny 4 modelové roztoky o přesně definovaném složení, zastupující každou skupinu potravin. Pro kyselé potraviny ($\text{pH} < 4,5$) byl připraven 3 % roztok kyseliny octové. Pro neutrální potraviny, které mají $\text{pH} > 4,5$ byla jako vhodné prostředí použita destilovaná voda. Pro alkoholické nápoje a potraviny byl připraven roztok 10 % ethanolu a pro tukové potraviny byla připravena 25 % emulze oleje ve vodě. Vzorek byl vždy připraven v poměru 1: 3 (liposomy:modelová potravina). Částice byly v těchto 4 modelových potravinách uchovány po dobu 24 hodin, 1 týdne a 1 měsíce, při teplotě 5°C. V uvedených intervalech byla změřena koncentrace uvolněných polyfenolů a lysozymu do roztoku.

5 Výsledky a diskuze

Tato práce byla zaměřena na studium enkapsulace přírodních antimikrobiálních extraktů z vybraných bylin a na enkapsulaci lysozymu. Byly testovány možnosti enkapsulace extraktů z šalvěže, rozmarýnu, kopřivy, hřebíčku, levandule, heřmánku a černého bezu. Všechny bylinné extrakty byly nejprve charakterizovány z hlediska obsahových látek a antioxidační aktivity a následně použity k enkapsulaci. Dále byla sledována antimikrobiální účinnost vybraných bylin a lysozymu a též stabilita částic v modelovém fyziologickém prostředí trávicího traktu a v modelových potravinách.

5.1 Stanovení koncentrace proteinů

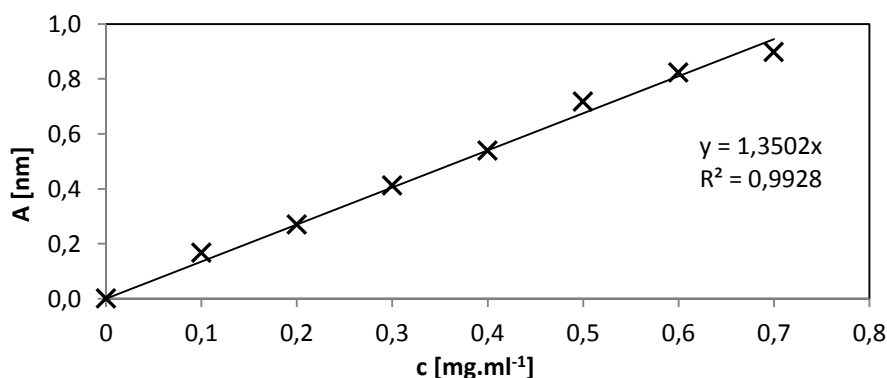
Ke stanovení koncentrace lysozymu byla sestavena kalibrační závislost (*Graf 1*) pro stanovení dle Hartree-Lowryho. Přesný návod je uveden v kap 4.6. Závislost byla stanovena pomocí lysozymu. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.



Graf 1: Kalibrační závislost lysozymu

5.2 Stanovení celkových polyfenolů

Pro stanovení koncentrace polyfenolů byla sestavena kalibrační závislost kyseliny gallové (*Graf 2*) dle návodu uvedeného v kapitole 4.7. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.



Graf 2: Kalibrační závislost polyfenolů

5.2.1 Stanovení obsahu polyfenolů v různých bylinných extraktech

Obsah polyfenolů ve vodném prostředí byl nejvyšší u hřebíčku 60,83 mg/g a nejnižší byl u heřmánku - 5,73 mg/g. V roztoku kyseliny citronové se největší množství polyfenolů uvolnilo z hřebíčku 61,18 mg/g a nejméně z heřmánku 2,05 mg/g. V etanolovém roztoku to bylo také tak, že nejvíce polyfenolů se uvolnilo z hřebíčku 91,73 mg/g a nejméně z heřmánku 3,47 mg/g. Obecně nejlepších výsledků bylo dosaženo u vodných extraktů (Tabulka 1).

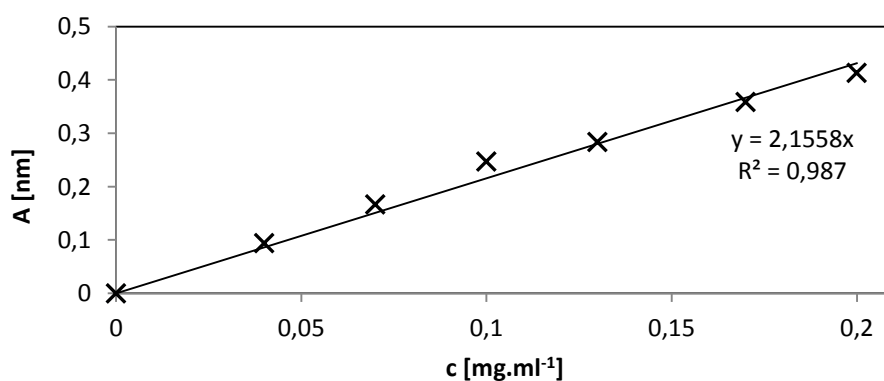
Každý extrakt byl analyzován dvakrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr.

Tabulka 1: Průměrný obsah polyfenolů ve vybraných bylinných extraktech

VODNÉ EXTRAKTY							
	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez
c [mg/g]	34,301	11,507	6,255	60,831	19,158	5,726	38,802
EXTRAKTY v 5% KYSELINY CIRONOVÉ							
	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez
c [mg/g]	15,721	15,454	10,541	61,719	11,184	2,054	36,449
EXTRAKTY v 20% ETHANOLU							
	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez
c [mg/g]	20,795	16,279	6,325	91,729	11,213	3,465	23,546

5.3 Stanovení celkových flavonoidů

Pro stanovení celkových flavonoidů byla sestavena kalibrační závislost katechinu (Graf 3) dle návodu, který je uveden v kap 4.8. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.



Graf 3: Kalibrační závislost flavonoidů

Flavonoidy byly poté analyzovány i v bylinných extraktech. Každý extrakt byl analyzován dvakrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr.

Tabulka 2: Stanovení obsahu celkových flavonoidů ve vodném extraktu ve vybraných bylinách

	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez
c [mg/g]	17,203	16,451	3,827	16,164	10,821	0,552	32,892

Obsah flavonoidů, které se uvolnily z bylin ve vodném prostředí, byl nejvyšší u černého bezu 32,89 mg/g a nejnižší u heřmánku 0,55 mg/g (Tabulka 2).

5.4 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS činidla

Pro stanovení antioxidační aktivity byl použit postup uvedený v kapitole 4.9. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočten průměr.

Tabulka 3: Hodnoty antioxidační aktivity vybraných bylin extrahovaných v různém prostředí

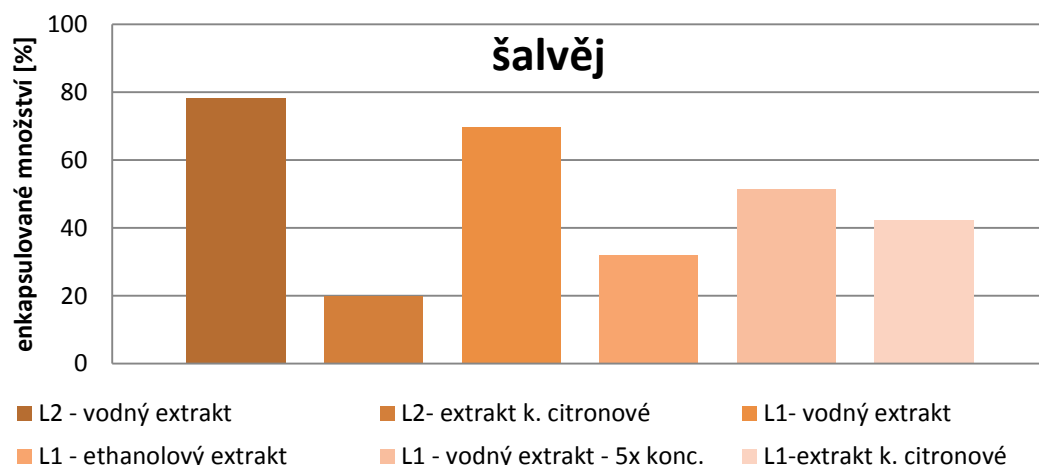
VODNÉ EXTRAKTY							
	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez
c [mg/g]	34,817	11,926	4,508	46,686	9,573	3,816	24,044
EXTRAKTY 5% KYSELINY CITRONOVÉ							
	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez
c [mg/g]	16,170	12,413	6,657	33,917	7,234	0,279	4,621
EXTRAKTY 20 % ETHANOLU							
	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez
c [mg/g]	25,56	9,98	4,410	41,33	10,38	3,83	14,86

Ve vodném, etanolovém extraktu i extraktu kyseliny citronové vykazoval největší antioxidační aktivitu hřebíček a nejnižší heřmánek (Tabulka 3).

5.5 Stanovení enkapsulačních účinností

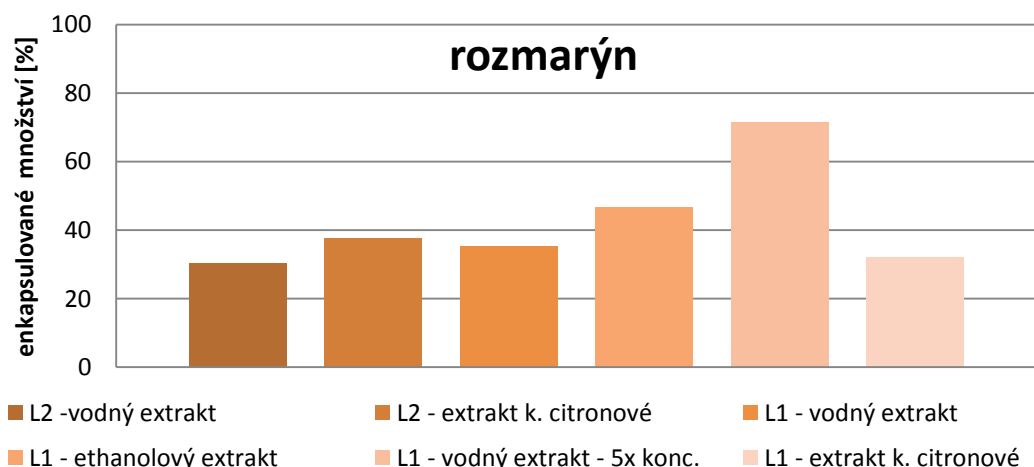
5.5.1 Stanovení enkapsulační účinnosti jednotlivých bylin

Bylinný extrakt po enkapsulaci do liposomů danými metodami (dle postupu uvedeného v kapitole 4.10) byl centrifugován 5 minut při 14 800 otáčkách za minutu. Supernatant byl slit, a byla v něm stanovována pomocí spektrofotometrické metody, koncentrace zbylých volných polyfenolů, stejně tak jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody pro polyfenoly. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.



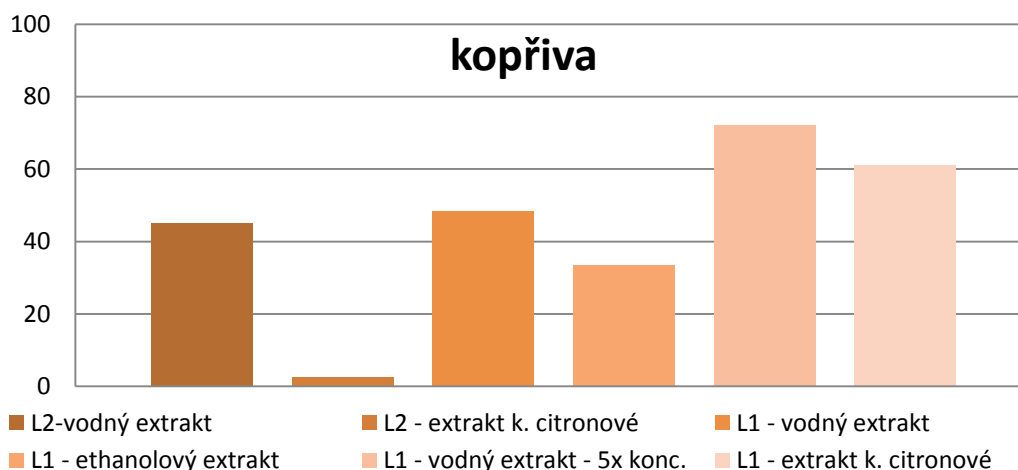
Graf 4: Enkapsulační účinnost šalvěje

U šalvěje došlo k největší enkapsulační účinnosti v případě, kdy z vodného extraktu šalvěje byly liposomy připravovány metodou 2. U metody byl použit k přípravě liposomů chloroform, ve kterém se lépe rozpustily cholesterol s lecitinem. Přesný postup přípravy těchto částic je uveden v kapitole 4.10.2. K nejmenšímu enkapsulačnímu účinku došlo při přípravě částic z extraktu kyseliny citronové metodou 2. Nejlépe se enkapsulovaly aktivní látky šalvěje z vodných extraktů (Graf 4).



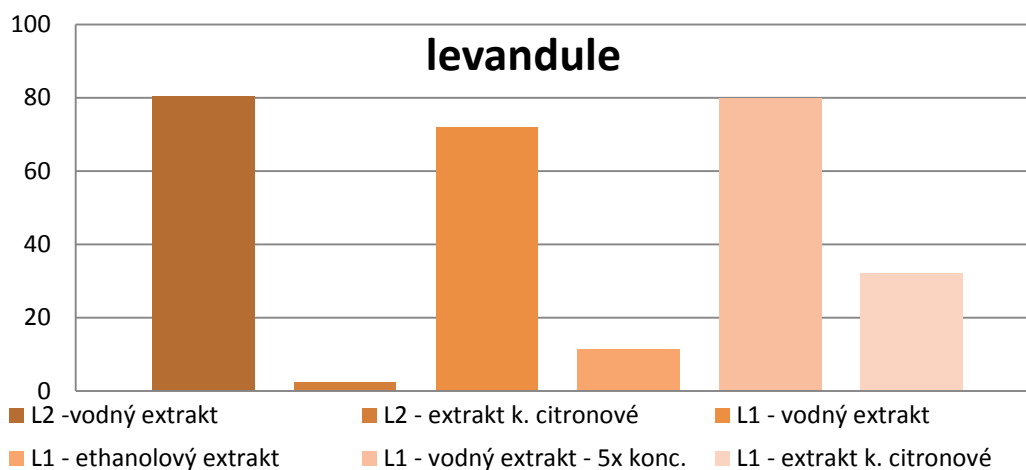
Graf 5: Enkapsulační účinnost rozmarýnu

Nejvyšší enkapsulační účinek u rozmarýnu nastal u liposomů připravených metodou 1 ve vodném extraktu, ve kterém bylo louhováno 5x větší množství bylinek. Tyto liposomy byly připraveny pomocí ultrazvuku. Přesný postup této metody je uveden v kapitole 4.10.1. Nejnižší hodnotu enkapsulačního účinku měly liposomy připravené metodou 1 v extraktu kyseliny citronové (Graf 5).



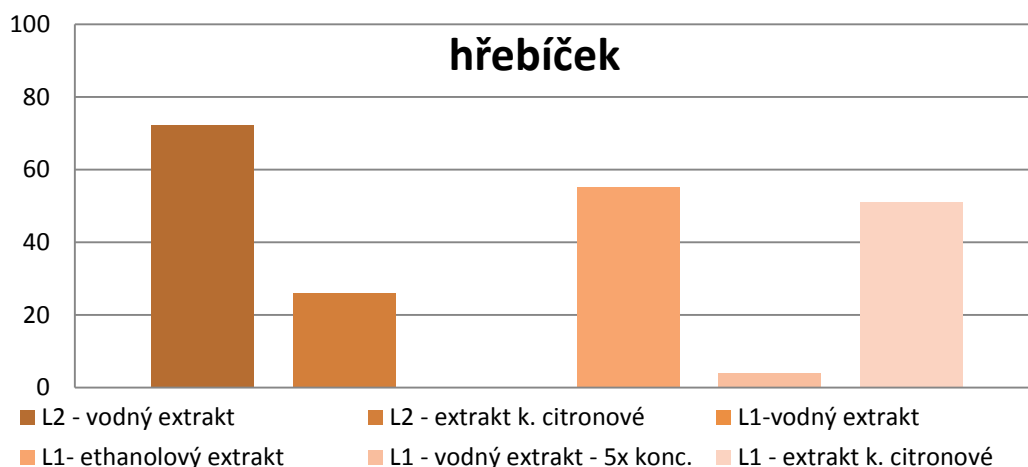
Graf 6: Enkapsulační účinnost kopřivy

U extraktu z kopřivy k největšímu enkapsulačnímu účinku docházelo při přípravě liposomů pomocí ultrazvuku metodou 1 v extraktu, kde byla louhována 5x větší navážka bylinek než u ostatních extraktů. Naopak k nejmenšímu enkapsulačnímu účinku došlo při přípravě liposomů metodou 2, jejíž přesný postup je popsán v kapitole 4.10.2, v extraktu kyseliny citronové (Graf 6).



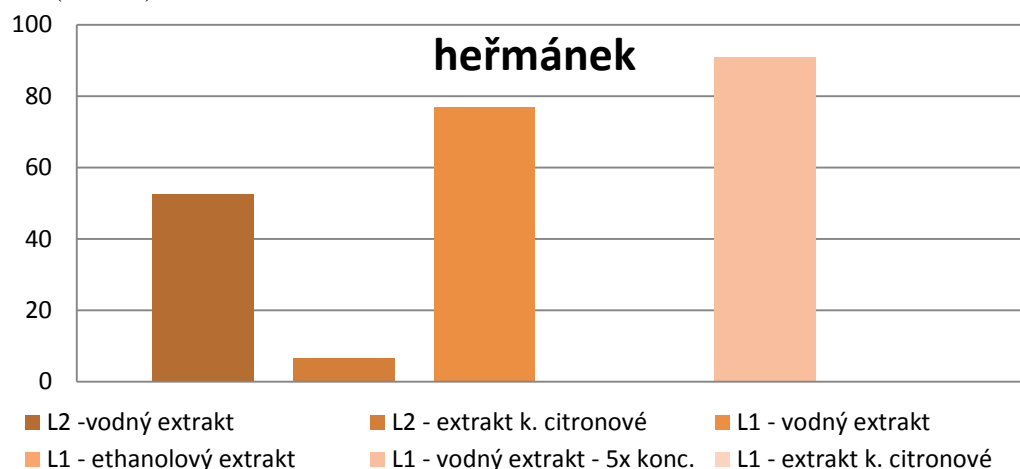
Graf 7: Enkapsulační účinnost levandule

Největší enkapsulační účinnost u levandule (Graf 7) byla při přípravě liposomů metodou 2 ve vodném prostředí a metodou 1 v extraktu, kde bylo louhováno 5x větší množství bylinek než u ostatních extraktů. Nejnížší enkapsulační účinnost měla příprava liposomů metodou 2, při níž byl použit chloroform, v extraktu kyseliny citronové. Nejlépe se enkapsulovaly aktivní látky levandule z prostředí vodného.



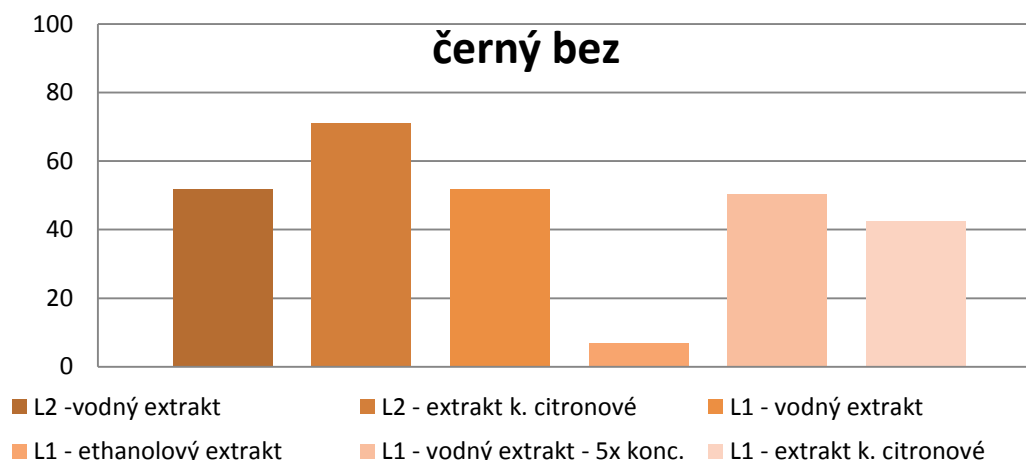
Graf 8: Enkapsulační účinnost hřebíčku

U hřebíčku byla nejvyšší enkapsulační účinnost pozorována při přípravě liposomů metodou, která využívá chloroform, tzn. metodou 2 ve vodném prostředí a nejnižší enkapsulační účinnost byla při ultrazvukové přípravě liposomů metodou 1 také ve vodném prostředí (Graf 8).



Graf 9: Enkapsulační účinnost heřmánku

Nejvyšší enkapsulační účinnosti u extraktu z heřmánku byly pozorovány u přípravy liposomů ultrazvukovou metodou 1 v extraktu, kde bylo louhováno 5x větší množství bylinek než u ostatních extraktů. Nejnižší enkapsulační účinnosti byly u přípravy liposomů metodou 1 v ethanolovém extraktu a extraktu kyseliny citronové. Nejvyšší enkapsulační účinnosti heřmánku byly pozorovány ve vodných extraktech (Graf 9).



Graf 10: Enkapsulační účinnost černého bezu

Liposomy připravené metodou 2 s chloroformem v extraktu kyseliny citronové měly u extraktu černého bezu nejvyšší enkapsulační účinnost. Nejnižší enkapsulační účinnost byla pozorována u přípravy částic metodou 1 v etanolovém prostředí (Graf 10).

Enkapsulační účinnosti aktivních látek závisí na typu vybrané metody přípravy částic a na prostředí, ve kterém jsou tyto aktivní látky louhovány. Při přípravě liposomových částic metodou 1 se nejvíce enkapsulovaly látky z vodných extraktů. Výjimku tvoří hřebíček, jehož aktivní látky se ve vodném prostředí neenkapsulovaly žádné. Připravujeme-li liposomy metodou 2 (tj metoda, při které se využívá chloroform pro lepší rozpuštění cholesterolu a lecitinu), je nejvyšší enkapsulační účinnost sledována rovněž ve vodných extraktech. Liposomy připravené metodou 2, nebyly vybrány k dalšímu testování, protože k jejich přípravě byl použit chloroform a takto připravené částice by nebyly příliš vhodné pro aplikace do potravin.

Závislosti enkapsulační účinnosti na způsobu přípravy liposomů a na extraktech jednotlivých bylinek jsou souhrnně uvedeny v následující Tabulce 4.

Tabulka 4: Enkapsulační účinnosti v závislosti na typu částice a na prostředí

		počáteční <i>c</i> polyfenolů [mg.ml ⁻¹]	<i>c</i> polyfenolů po enkapsulaci [mg.ml ⁻¹]	enkapsulované množství [%]
L1 vodného extraktu	šalvěj	0,752	0,228	69,70
	rozmarýn	0,251	0,163	35,30
	kopřiva	0,130	0,067	48,50
	hřebíček	1,251	1,572	0,00
	levandule	0,412	0,116	71,90
	heřmánek	0,127	0,029	77,00
	černý bez	0,823	0,397	51,70
L1 extraktu 20 % EtOH	šalvěj	0,439	0,299	32,00
	rozmarýn	0,329	0,176	46,50
	kopřiva	0,133	0,088	33,50
	hřebíček	1,919	0,859	55,30
	levandule	0,240	0,213	11,20
	heřmánek	0,076	0,083	0,00
	černý bez	0,489	0,456	6,77
L1 extraktu 5 % kyseliny citronové	šalvěj	0,319	0,184	42,40
	rozmarýn	0,319	0,217	32,10
	kopřiva	0,225	0,087	61,19
	hřebíček	1,279	0,626	51,06
	levandule	0,229	0,156	31,90
	heřmánek	0,046	0,110	0,00
	černý bez	0,742	0,428	42,40
L2 vodného extraktu	šalvěj	0,752	0,165	78,10
	rozmarýn	0,251	0,175	30,40
	kopřiva	0,130	0,071	45,00
	hřebíček	1,251	0,347	72,20
	levandule	0,412	0,081	80,50
	heřmánek	0,127	0,060	52,70
	černý bez	0,823	0,396	51,70
L2 extraktu 5 % kyseliny citronové	šalvěj	0,160	0,128	20,00
	rozmarýn	0,160	0,100	37,60
	kopřiva	0,113	0,110	2,40
	hřebíček	0,639	0,473	26,00
	levandule	0,114	0,112	2,10
	heřmánek	0,023	0,022	6,61
	černý bez	0,371	0,107	71,06

5.5.2 Stanovení enkapsulační účinnosti lysozymu

Roztok lysozymu o koncentraci 0,451 mg/ml byl po enkapsulaci danými metodami centrifugován 5 minut při 14 800 ot/min, supernatant byl slit, a byla v něm stanovována pomocí spektrofotometrické metody koncentrace volného lysozymu, stejně tak jako ve vzorku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost dané metody. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Metody pro přípravu jednotlivých typů liposomů jsou uvedeny v kapitole 4.10.

Vyšší enkapsulační účinnosti bylo dosaženo při přípravě liposomů metodou 1, (tj. metoda, při které dochází k rozpuštění cholesterolu a lecitinu v roztoku, přesný postup této metody je uveden v kapitole 4.10.1), kde enkapsulační účinnost činila 39,12%. U metody 2 (tj. metoda, při níž je využíván chloroform, přesný postup je popsán v kapitole 4.10.2) byla enkapsulační účinnost pouze 15,99 %.

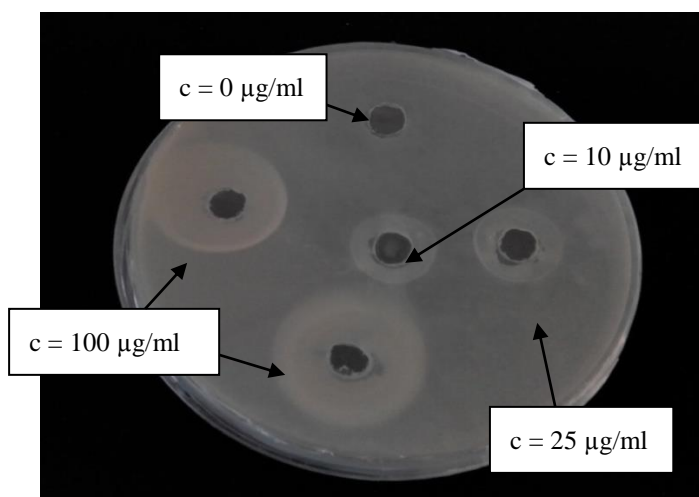
Tabulka 5: Enkapsulační účinnost lysozymu

Enkapsulace lysozymu	počáteční koncentrace liposomu [mg.ml ⁻¹]	Koncentrace po enkapsulaci [mg.ml ⁻¹]	enkapsulované množství [%]
L1	0,451	0,275	39,12
L2	0,451	0,379	15,99

5.6 Stanovení antimikrobiální aktivity - antimikrobiální testy

5.6.1 Agarová difúzní metoda

V tomto testu se do vyhloubených jamek, v médiu s naočkovaným mikroorganismem, rovnou pipetoval připravený roztok obsahující antimikrobiální látku. Po inkubaci se odečetly inhibiční zóny, které jsou zaznamenány v Tabulce 6 a Tabulce 7. Přesný postup této metody je uveden v kapitole 4.12.2.



Obrázek 13: Agarová difúzní metoda lysozymu

Na obrázku 13 jsou zřetelně vidět inhibiční zóny způsobené odlišnými koncentracemi lysozymu.

Tabulka 6: Inhibiční zóny různých koncentrací lysozymu

	inhibiční zóna [mm]				
	100µg/ml	75 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	10 µg/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	17	15	12	10	7
<i>Micrococcus luteus</i>	19	15	11	9	7
<i>Serratia marcescens</i>	17	14	9	6	4
<i>Escherichia coli</i>	5	3	1,6	0	0

Nejúčinnější byl roztok lysozymu o nejvyšší připravené koncentraci 100µg/ml na kmen *M. luteus*. Nejúčinněji působil lysozym na zástupce gram pozitivních mikroorganismů. Všechny inhibiční zóny lysozymu jsou uvedeny v Tabulce 6.

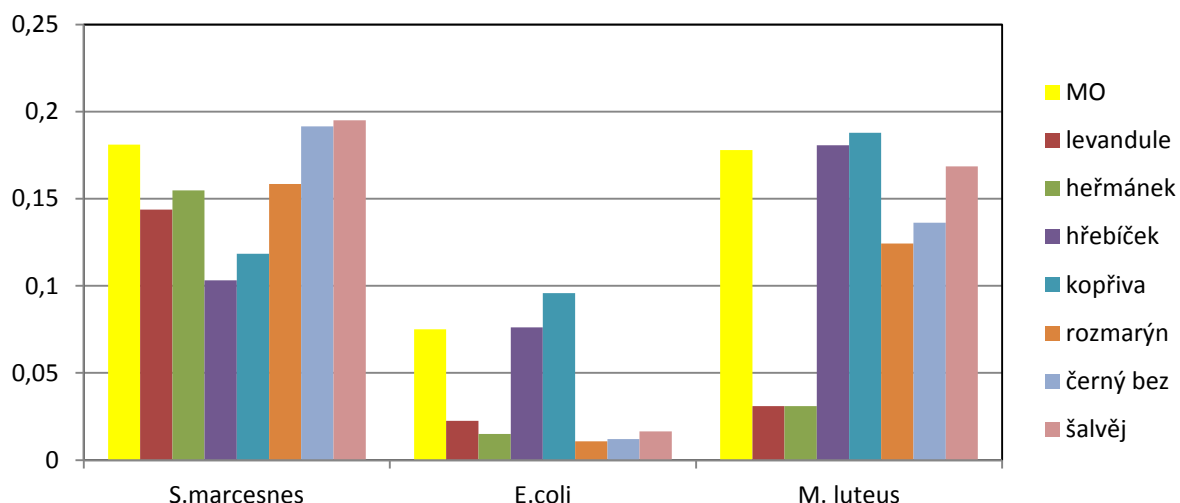
Tabulka 7: Rozměry inhibiční zóny vzniklé působením extraktů bylin

	inhibiční zóna [mm]							
	H ₂ O	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	levandule	hřebíček	heřmánek	černý bez
<i>Bacillus subtilis</i>	0	4,5	1	2	1,5	6	1	5
<i>Micrococcus luteus</i>	0	7,5	6	1	2	5	1	5
<i>Serratia marcescens</i>	0	3	5	4,5	1	1	1	4
<i>Escherichia coli</i>	0	4,5	5	6	10	9	8	7

Bylinné extrakty působící na vybrané kmeny mikroorganismů měly koncentraci 0,1 g/ml. Na kmen *E. coli* měl největší antimikrobiální účinek extrakt levandule a naopak nejmenší účinek měl extrakt šalvěje. Na kmeni *S. marcescens* měl nejvyšší antimikrobiální účinek extrakt rozmarýnu. Na kmen *M. luteus* měl největší účinek extrakt šalvěje, a nejnižší extrakt heřmánku. Na *B. subtilis* měl nejvyšší antimikrobiální účinek extrakt hřebíčku a nejnižší extrakty rozmarýnu a heřmánku. Rozdílné inhibiční zóny jsou důsledkem rozmanitého obsahu aktivních látek v bylinkách, které působí na rozpad buněčných stěn. Všechny inhibiční zóny extraktů bylinek jsou zaznamenány v Tabulce 7.

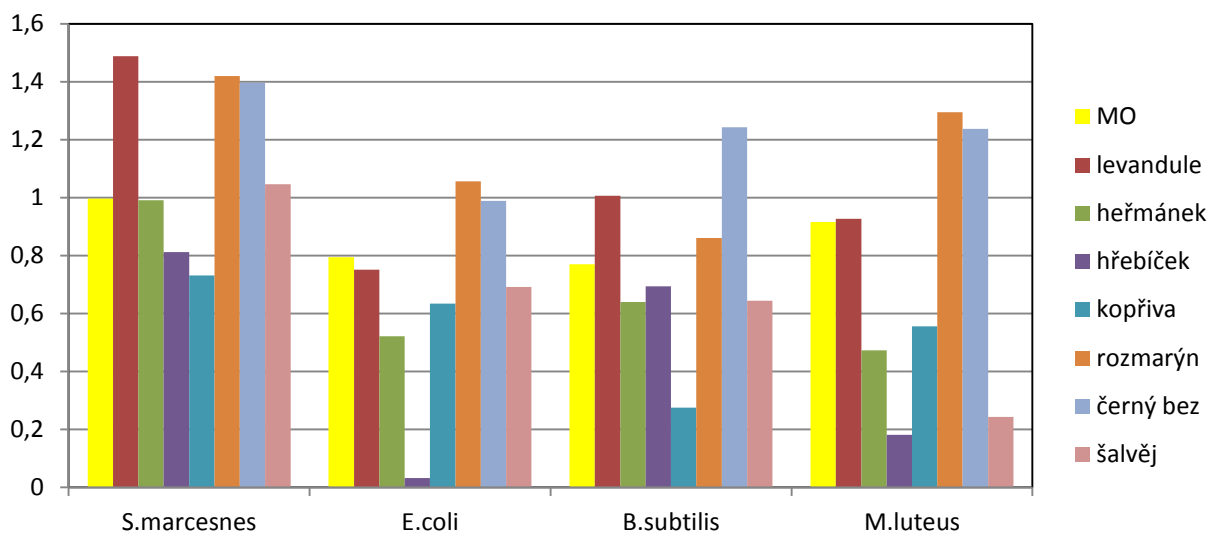
5.6.2 Bujónová diluční metoda

V tomto testu byly určovány inhibiční koncentrace antimikrobiálních látek pomocí mikrotitrační destičky na vybrané kmeny mikroorganismů. K určení aktivity byly připraveny srovnávací suspenze mikroorganismů s vodou. Použité extrakty bylinek byly vybrány na základě zjištěných charakteristik jednotlivých bylin. Byly použity vodné extrakty bylinek a roztok lysozymu o různých koncentracích od 10 µg/ml do 100 µg/ml. Přesný postup této metody je popsán v kapitole 4.12.1.



Graf 11: Antimikrobiální účinky bylinných extraktů na vybrané kmeny MO po 3-hodinové inkubaci

Po 3 hodinách inkubace se u kmene *S. marcescens* projevíly antimikrobiální účinky u extraktů levandule, heřmánku, hřebíčku a kopřivy. U kmene *E. coli* měly antimikrobiální účinek extrakty levandule, heřmánku, rozmarýnu, černého bezu a šalvěje. Na kmeni *M. luteus* se projevil antimikrobiální účinek u extraktu levandule, heřmánku, rozmarýnu, černého bezu a šalvěje (Graf 11).

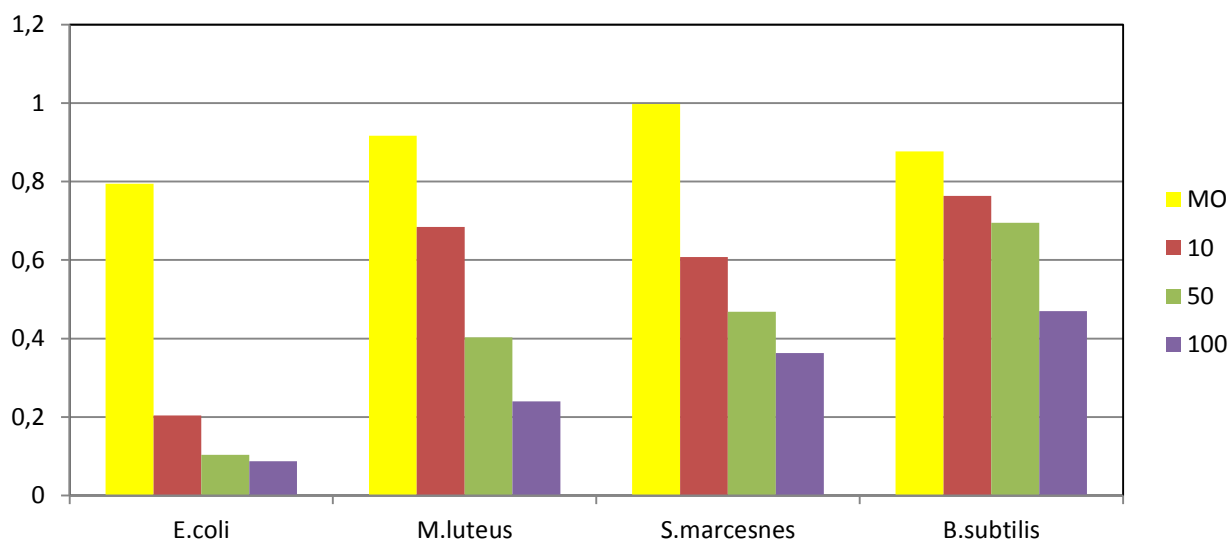


Graf 12: Znárodnění antimikrobiální aktivity jednotlivých bylinných extraktů na vybrané kmeny MO po 24 hodinách působení

Po 24-hodinové inkubaci se u bakterie *S. marcescens* projevíla viditelná antimikrobiální aktivita u extraktu hřebíčku a kopřivy. Minimální antimikrobiální aktivitu vykazoval i extrakt heřmánku. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu, po 24 hodinové inkubaci, u *E. coli* vykazoval extrakt hřebíčku. Dalšími extrakty vykazující antimikrobiální aktivitu u kmene *E. coli* byly extrakty levandule, heřmánku, šalvěje a kopřivy.

Po 24-hodinové inkubaci *B. subtilis*, se projevíly antimikrobiální účinky u extraktů heřmánku, hřebíčku, kopřivy a také u extraktu šalvěje. Antimikrobiální aktivity vůči kmeni *M. luteus* vykazovaly extrakty heřmánku, hřebíčku, kopřivy a šalvěje (Graf 12).

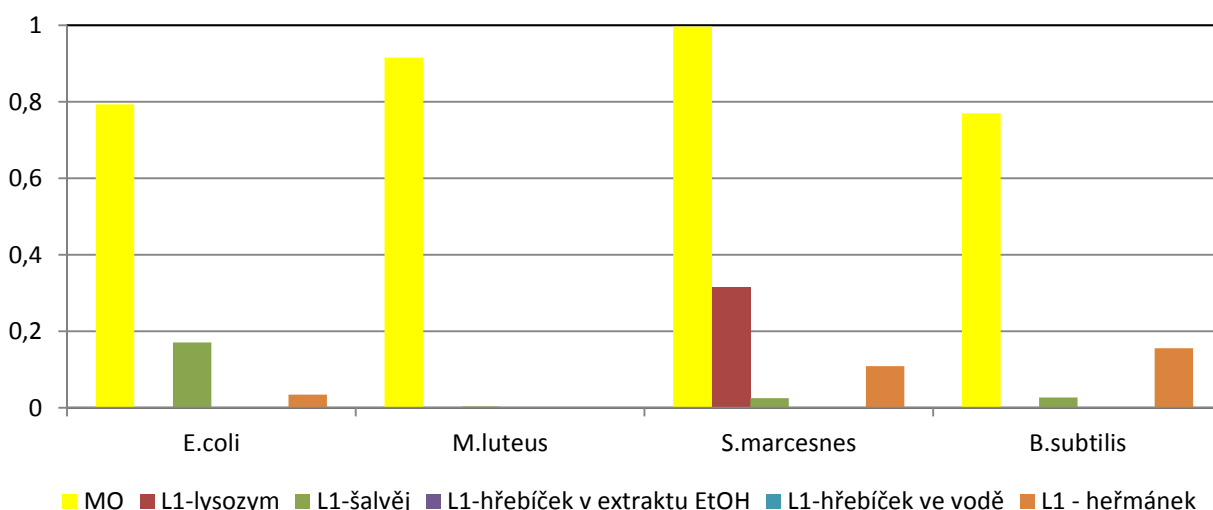
Vodné extrakty šalvěje projevíly svou antimikrobiální aktivitu pouze u grampozitivních bakterií. Zajímavé je, že u některých vybraných bylinek, byl antimikrobiální účinek zaznamenán pouze po 3 hodinách kultivace, zatímco po 24 hodinách docházelo k růstu srovnatelnému s blankem. Antimikrobiální aktivity všech vybraných bylinek jsou zaznamenány v grafech 11 a 12.



Graf 13: znázornění antimikrobiální aktivity lysozymu na vybrané kmeny MO po 24 hodinách působení

Po 24-hodinové inkubaci v mikrotitračních destičkách se nejvyšší antimikrobiální aktivita projevovala u roztoku lysozymu s koncentrací, $c = 100 \mu\text{g/ml}$.

Lysozym má antimikrobiální účinek na obě skupiny mikroorganismů. Antimikrobiální aktivita lysozymu se projevuje viditelněji u gramnegativních bakterií (Graf 13).



Graf 14: Znáznornění antimikrobiální aktivity částic na vybrané kmeny MO po 24 hodinách působení

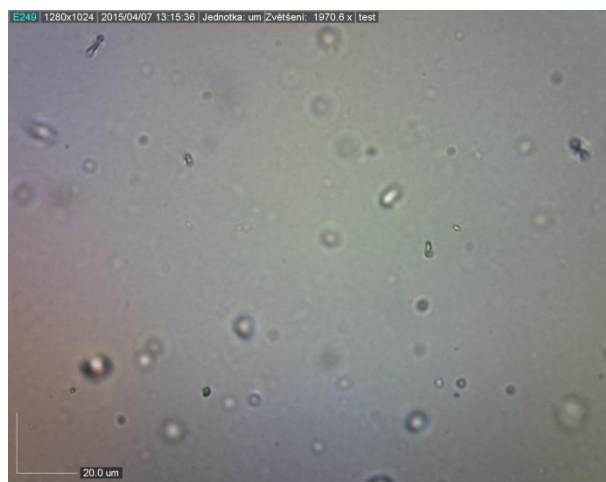
Po 24 hodinách inkubace se u *E. coli* největší antimikrobiální účinek projevil u liposomů s extrakty lysozymu a hřebíčku v etanolovém i vodném prostředí. Nejnižší účinek měly liposomy se šalvějí. U *S. marcescens* nejvyšší účinek vykazovaly liposomy s hřebíčkem taktéž v obou prostředích. Nejnižší účinek na tuto bakterii měly liposomy s lysozymem. Na *M. luteus* měly všechny testované liposomy maximální antimikrobiální účinek. U *B. subtilis* byly pozorovány největší účinnosti u liposomů s lysozymem a hřebíčkem v prostředí etanolovém i vodném. Nejnižší účinek u *B. subtilis* vykazovaly liposomy s heřmánkem (Graf 14).

Z uvedených výsledků lze uzavřít, že všechny testované bylinky enkapsulované v liposomech vykazovaly antimikrobiální účinky. Nejlepší účinky měly liposomy na kmen *M. luteus* a obecně na grampozitivní bakterie. Nejlepší účinnost na všech kmenech vykazovaly liposomy s enkapsulovaným hřebíčkem v etanolovém i vodném prostředí.

5.7 Vizualizace částic pomocí optického mikroskopu



Obrázek 14: Prázdné liposomy L1



Obrázek 15: Liposomy L1 s enkapsulovaným černým bezem

Na obrázku 14 jsou znázorněny prázdné liposomy připravené metodou 1. Na obrázku 15 jsou zachyceny liposomy s enkapsulovanou složkou kopřivy. Enkapsulovaná složka zvětšuje velikost liposomů.

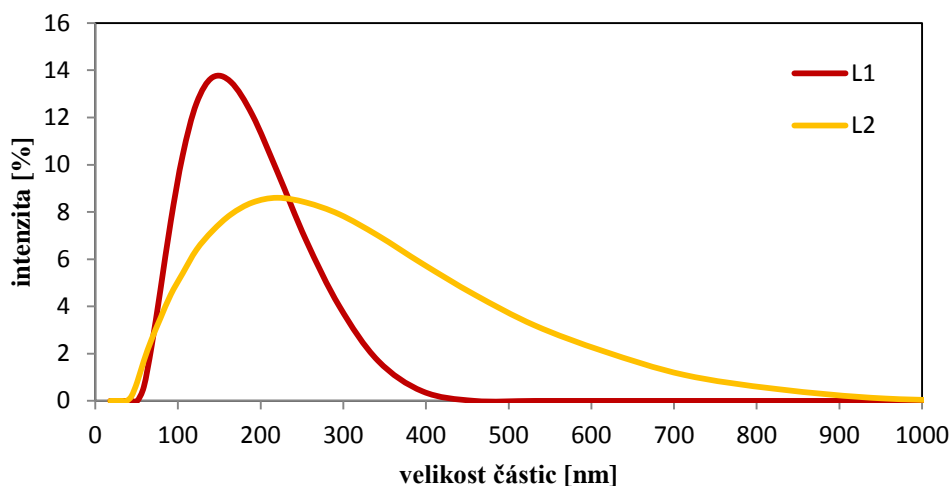
5.8 Určení velikosti částic

Po vhodném naředění vzorku byla velikost liposomových částic stanovena za použití přístroje ZetasizerNano ZS (2.3.1). Metoda stanovení velikosti částic je zde založena na měření rozptylu světla, tzv. DLS (dynamický rozptyl světla, „Dynamic Light Scattering“). Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.

Tabulka 8: Průměrná velikost liposomů s enkapsulovanými antimikrobiálními extrakty a lysozymem

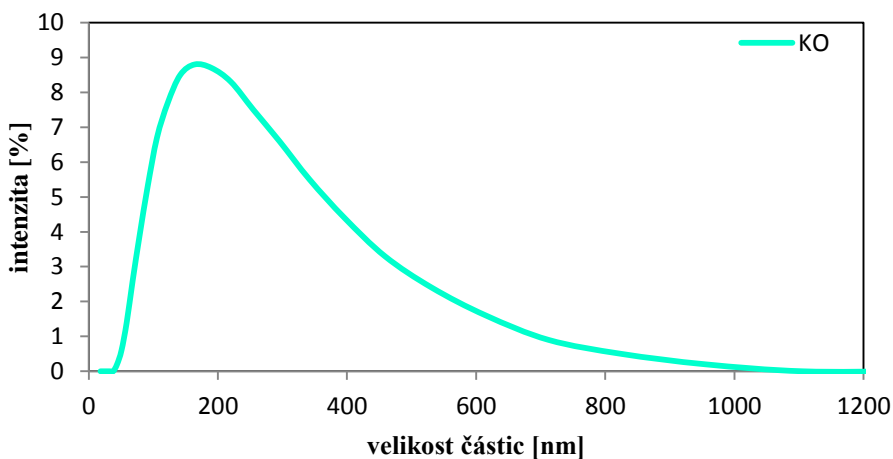
	L1	L2	rozmarýn	kopřiva	šalvěj
průměrná velikost	167 nm	212 nm	186 nm	192 nm	188 nm
	hřebíček	černý bez	heřmánek	levandule	lysozym
průměrná velikost	121 nm	204 nm	202 nm	183 nm	281 nm

Prázdné liposomy připravené metodou 2 byly o něco větší (212 nm) než prázdné liposomy připravené metodou 1 (167 nm). Obě tyto metody byly popsány v kapitole 4.10. Největší velikost liposomů byla naměřena při enkapsulaci lysozymu, kdy byla průměrná velikost částic 281 nm. Obecně se v porovnání s prázdnými částicemi vlivem enkapsulace bylinných extraktu jejich velikost zvětšila, pouze u enkapsulace extraktu z hřebíčku byla velikost liposomů menší, a to v průměru 121 nm (Tabulka 8).



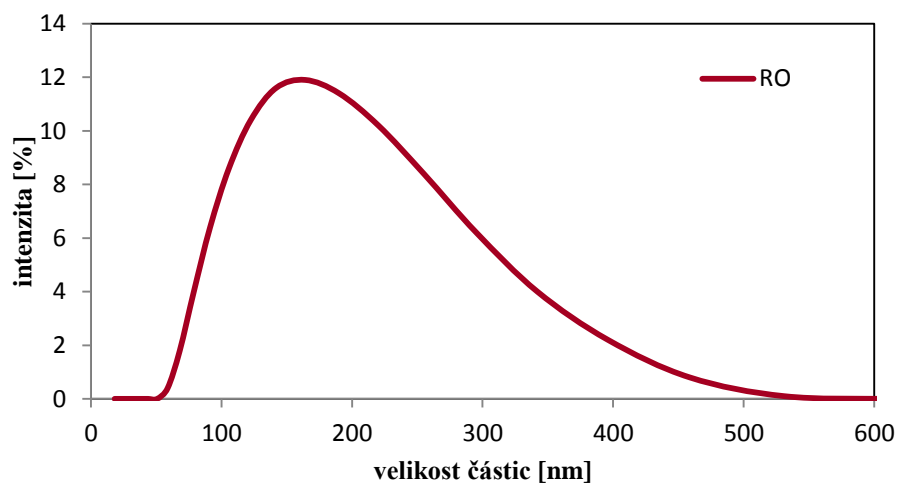
Graf 15: Rozdíl velikostí mezi částicemi L1 a L2

Liposomy připravené metodou 1 se pohybovaly v rozmezí od 68 nm do 459 nm. Nejvíce zastoupené byly částice o velikosti 164 nm. Metodou 2 byly připraveny částice v rozmezí velikostí od 34 nm do 1718 nm. Nejvíce částic připravených metodou 2 mělo velikost 255 nm. Liposomy připravené metodou 2 byly tedy o něco větší (Graf 15).



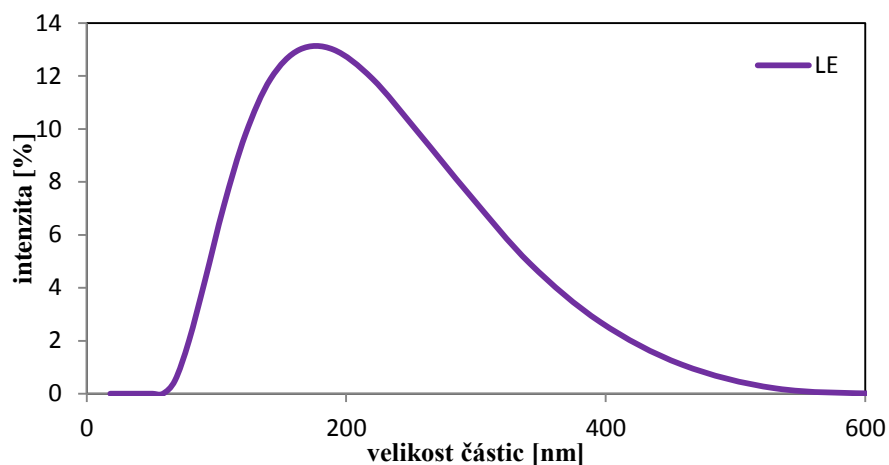
Graf 16: Distribuce velikosti částic – liposomy L1 s enkapsulovanou kopřivou

Velikost liposomů s enkapsulovanými aktivními látkami kopřivy se pohybovala v rozmezí od 37 nm do 1000 nm. Nejčastější velikost liposomů s kopřivovým extraktem se pohybovala okolo hodnoty 255 nm (Graf 16).



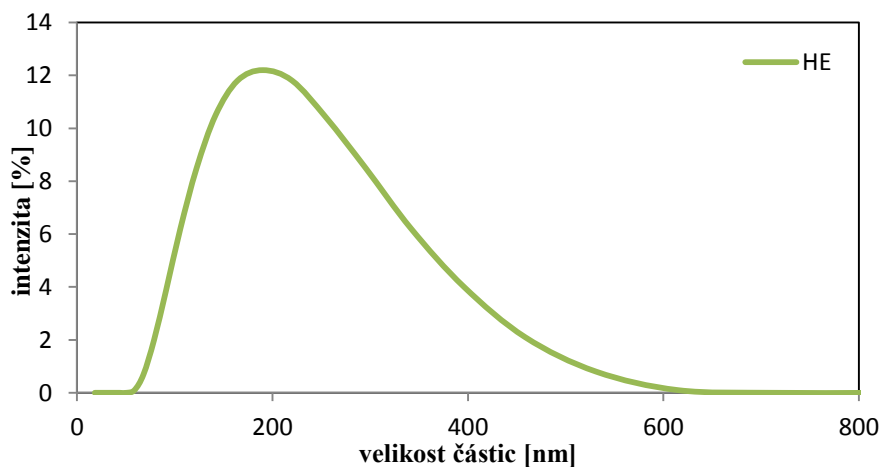
Graf 17: Distribuce velikosti částic – liposomy L1 s enkapsulovaným rozmarýnem

Velikosti liposomů s enkapsulovanými částicemi rozmarýnu se pohybovaly v rozmezí od 60 nm do 830 nm. Velikost největšího počtu připravených liposomů se pohybovala okolo hodnoty 190 nm (*Graf 17*).



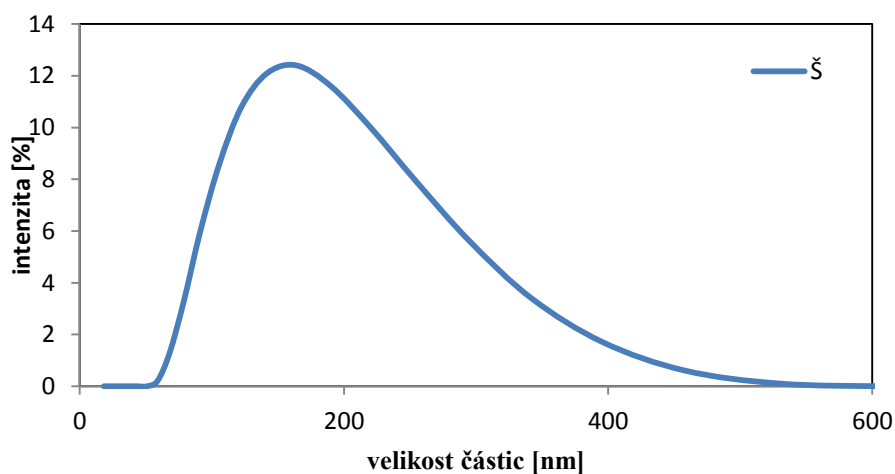
Graf 18: Distribuce velikosti částic – liposomy L1 s enkapsulovanou levandulí

Velikost liposomů s enkapsulovanou levandulí se pohybuje v rozmezí od 78 nm do 615 nm. Nejvíce zastoupené byly částice o velikosti 200 nm (*Graf 18*).



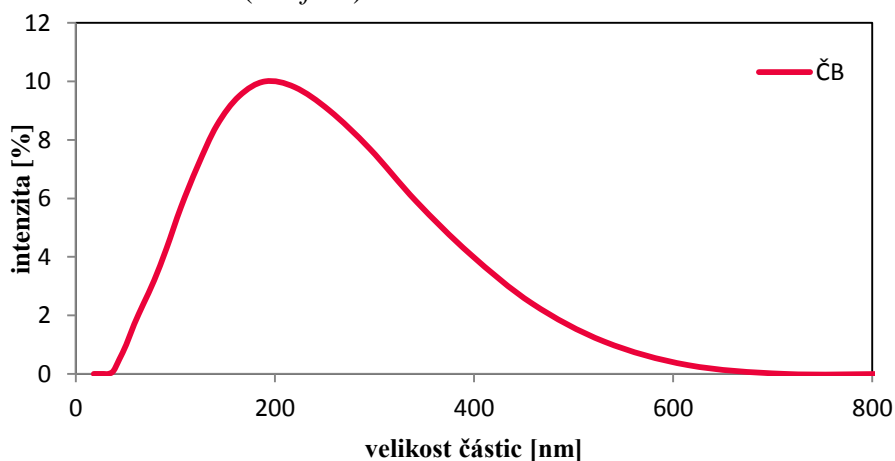
Graf 19: Distribuce velikosti částic – liposomy L1 s enkapsulovaným heřmánkem

Velikost připravených liposomů s heřmánkem se pohybovala v rozmezí od 68 nm do 712 nm. Nejvíce zastoupená skupina částic měla velikost 220 nm (Graf 19).



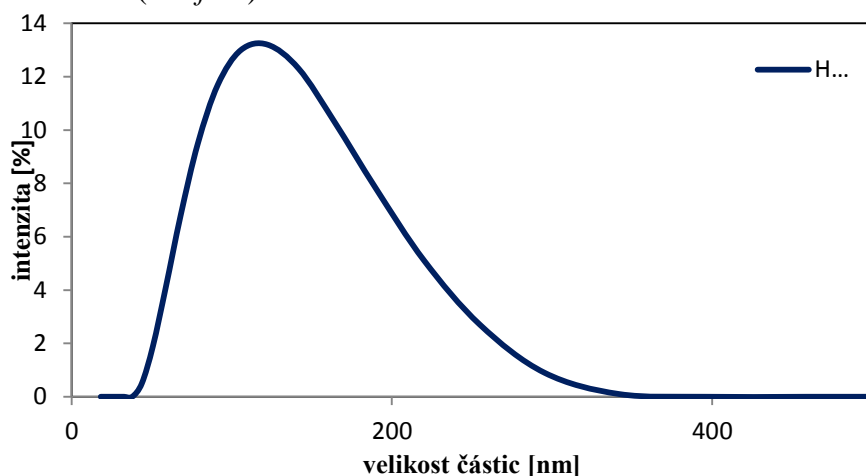
Graf 20: Distribuce velikosti částic – liposomy L1 s enkapsulovanou šalvějí

Rozmezí velikostí liposomů se šalvějí bylo od 68 nm do 615 nm. Nejvíce zastoupená skupina měla velikost 190 nm (Graf 20).



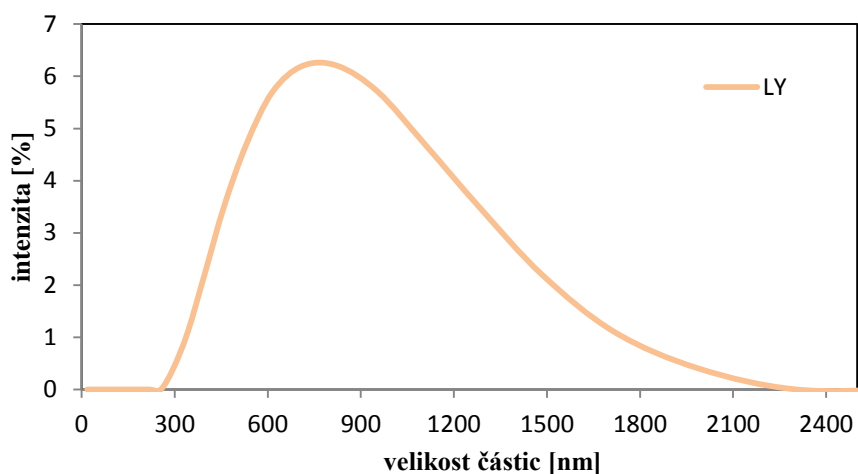
Graf 21: Distribuce velikosti částic – liposomy L1 s enkapsulovaným černým bezem

Liposomy s černým bezem měly rozmezí velikosti od 43 nm do 712 nm. Nejvíce částic mělo velikost 220 nm (Graf 21).



Graf 22: Distribuce velikosti částic – liposomy L1 s enkapsulovaným hřebíčkem

Připravené liposomy s hřebíčkem se pohybovaly v rozmezí velikostí od 24 nm do 396 nm. Nejvíce částic mělo velikost 141 nm (Graf 22).



Graf 23: Distribuce velikosti částic – liposomy L1 s enkapsulovaným lysozymem

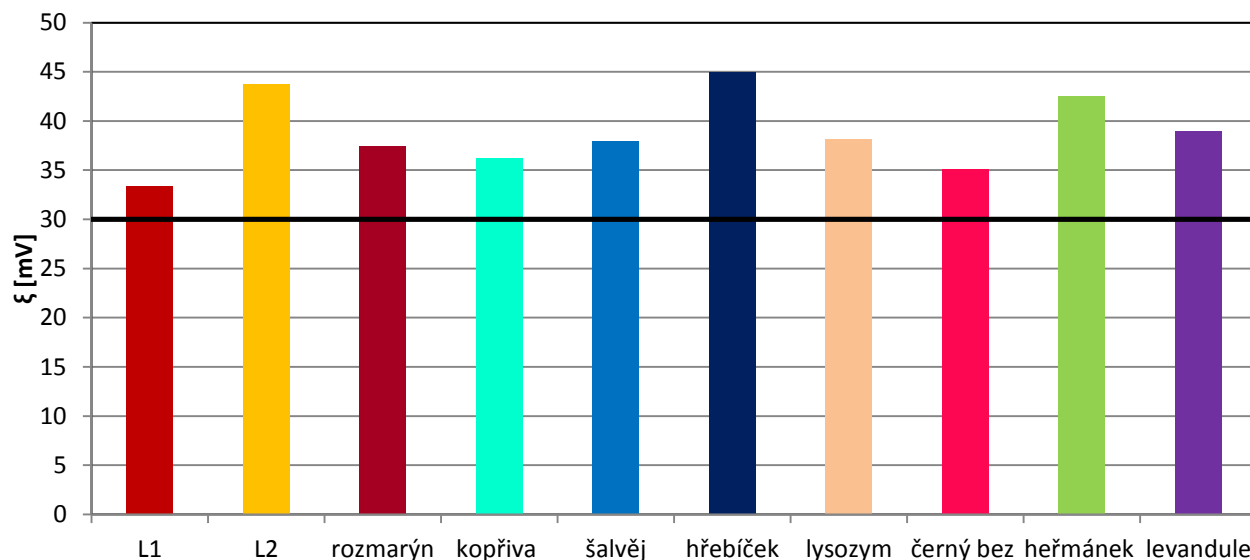
Liposomy s lysozymem se pohybovaly v rozmezí 342 nm do 2305 nm. Nejvíce částic mělo velikost okolo 875 nm. Větší velikost těchto částic může být způsobena hlavně díky větší velikosti samotného lysozymu (Graf 23).

5.9 Určení stability připravených částic

Po vhodném naředění byla stabilita liposomových částic měřena pomocí zeta potenciálu na přístroji ZetasizerNano od firmy Malvern Instruments Ltd. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.

Tabulka 9: Hodnoty zeta potenciálu připravených částic

	L1	L2	rozmarnýn	kopřiva	šalvěj
ξ [mV]	-33,40	-43,77	-37,43	-36,20	-38,0
	hřebíček	černý bez	heřmánek	levandule	lysozym
ξ [mV]	-44,93	-38,20	-35,10	-42,53	-39,00



Graf 24: Grafické znázornění stability částic

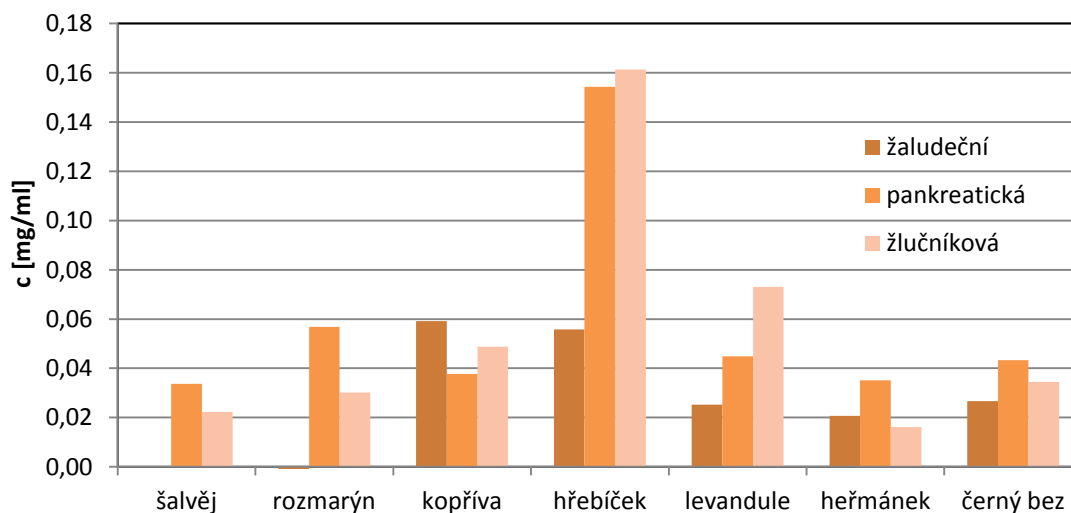
Naměřené hodnoty zeta potenciálu vytvořených liposomů se ve všech případech nacházely mimo interval nestability, který se nachází mezi -30 mV až 30 mV. Je možné tedy o všech částicích říci, že jsou stabilní. Největší zeta potenciál $-44,93$ mV byl stanoven u enkapsulovaného hřebíčku, naopak nejmenší $-33,40$ mV u prázdných liposomů (Graf 24). Vlivem enkapsulace všech složek tedy došlo ke zvýšení stability v porovnání s prázdnými částicemi.

5.10 Stanovení stability částic v trávících šťávách

Liposomy připravené metodou 1, která byla vyhodnocena jako nejvhodnější, byly smíseny s trávící šťávou vždy v poměru $1 : 1$ (roztok částic : trávící šťáva). Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány 5 minut při $14\,800$ otáčkách za minutu, supernatant byl slit, a byla v něm stanovována pomocí spektrofotometrické metody koncentrace uvolněných polyfenolů, stejně tak jako ve vzorku před trávením. Z těchto dvou hodnot bylo vypočítáno množství uvolněných polyfenolů působením jednotlivých trávících šťáv. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Metody pro přípravu jednotlivých typů trávících šťáv a postupy při trávení jsou uvedeny v kapitole 4.13.

Tabulka 10: Stabilita částic v modelových trávicích šťávách

	množství uvolněných polyfenolů c [mg.ml ⁻¹]						
	šalvěj	rozmarýn	kopřiva	hřebíček	levandule	heřmánek	černý bez
žaludeční	0,00	0,00	0,06	0,06	0,03	0,02	0,03
pankreatická	0,034	0,057	0,038	0,154	0,045	0,035	0,043
žlučnicková	0,022	0,030	0,049	0,161	0,073	0,016	0,034



Graf 25: Množství uvolněných polyfenolů z částic vlivem trávicích šťáv

Připravené liposomy byly v žaludeční šťávě poměrně stabilní. Nejvíce bylo v této šťávě rozloženo liposomů s enkapsulovaným extraktem kopřivy a hřebíčku. Nejméně bylo rozloženo liposomů s enkapsulovanými extrakty šalvěje a rozmarýnu.

V pankreatické šťávě by mělo dojít k uvolnění největšího množství aktivních látek. V této modelové šťávě byly nejvíce rozloženy liposomy s enkapsulovaným extraktem z hřebíčku a nejméně liposomy s enkapsulovaným extraktem šalvěje a heřmánku. Nejvíce uvolněných polyfenolů ve žlučnickové šťávě bylo uvolněno z liposomů s enkapsulovaným extraktem hřebíčku a nejméně heřmánku a šalvěje (Graf 25).

5.11 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Liposomy připravené metodou 1, která byla vyhodnocena jako nejvhodnější, byly smíseny s modelovou potravinou vždy v poměru 1 : 3 (roztok částic : modelová potravina). V jednotlivých časech byly vzorky centrifugovány 5 minut při 14 800 otáčkách za minutu, supernatant byl slit, a byla v něm stanovována pomocí spektrofotometrické metody koncentrace uvolněných polyfenolů, stejně tak jako ve vzorku v čase 0. Z těchto dvou hodnot bylo vypočítáno množství uvolněných polyfenolů z liposomů v modelových potravinách v jednotlivých časech. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Metody pro přípravu jednotlivých typů modelových potravin jsou uvedeny v kapitole 4.14.

Tabulka 11: Dlouhodobá stabilita připravených částic

	HEŘMÁNEK	ČERNÝ BEZ	ŠALVĚJ	HŘEBÍČEK	LYSOZYM
	MODEL Č.1 - VODA				
t = 1 týden	44,068 %	0,000 %	6,417 %	0,000 %	27,792 %
t = 1 měsíc	0,000 %	0,000 %	12,139 %	0,000 %	30,154 %
	MODEL Č.2 – 3% KYSELINA OCTOVÁ				
t = 1 týden	0,000 %	0,000 %	8,252 %	0,000 %	7,237 %
t = 1 měsíc	0,000 %	0,000 %	55,340 %	0,000 %	32,754 %
	MODEL Č.3 – 10% ETHANOL				
t = 1 týden	0,000 %	0,000 %	12,500 %	0,000 %	0,000 %
t = 1 měsíc	0,000 %	0,000 %	41,346 %	0,000 %	50,993 %
	MODEL Č.4 – 24% OLEJ				
t = 1 týden	27,407 %	28,526 %	37,083 %	25,134 %	97,180 %
t = 1 měsíc	5,926 %	0,000 %	7,083 %	0,000 %	101,976 %

V modelové potravíně č. 1 (voda) po týdnu inkubace při teplotě 5 °C docházelo k největšímu uvolnění aktivních látek z liposomů s extraktem heřmánku, kdy se uvolnilo 44,07 %. Nejstabilnější byly liposomy s enkapsulovaným černým bezem a hřebíčkem. Po měsíční inkubaci se uvolnilo nejvíce aktivních látek z lysozymu. Nejstabilnější zůstaly částice s černým bezem a hřebíčkem. U heřmánku se během měsíční inkubační doby rozpustily všechny částice, které s největší pravděpodobností degradovaly a usadily se na dno.

V modelové potravíně č. 2 byly nejstabilnější liposomy s enkapsulovanými aktivními látkami heřmánku, černého bezu a hřebíčku. Z částic šalvěje a lysozymu se uvolnilo minimální množství enkapsulovaných látek. V tomto případě lze říci, že částice uchovávané v kyselém prostředí po dobu 1 týdne jsou stabilní.

Po měsíční inkubační době se z liposomů s heřmánkem, černým bezem a hřebíčkem také neuvolnily enkapsulované látky a částice zůstaly stabilní. Z liposomů se šalvějí se uvolnilo 55,34 % enkapsulovaných látek a z liposomů s lysozymem se uvolnilo 32,75 %.

V modelové potravíně č. 3 byly, po týdenní inkubaci, částice s obsahem extraktu heřmánku, černého bezu, hřebíčku a lysozymu stabilní, což znamená, že se neuvolnilo žádné enkapsulované množství antimikrobiálních látek. Z liposomů s enkapsulovanou šalvějí se uvolnilo pouze 12,50 %. Z tohoto můžeme vyvodit, že po týdnu jsou liposomy v prostředí etanolu stabilní. Z liposomů s obsahem enkapsulovaného extraktu heřmánku, černého bezu a hřebíčku se po měsíční inkubační době v etanolovém prostředí také neuvolnily žádné enkapsulované látky. Z liposomů šalvěje se uvolnilo 41,346 % a z liposomů s lysozymem 50,993 %.

V modelové potravíně č. 4 došlo po týdenní inkubaci k největšímu uvolnění enkapsulovaných látek z liposomů s lysozymem. Nejlepší stabilitu v této modelové potravíně měly liposomy s enkapsulovanými látkami hřebíčku, kdy se uvolnilo pouze 25,13 % látek. Po měsíci inkubace došlo k největšímu uvolnění enkapsulovaných látek u částic lysozymu.

U ostatních testovaných liposomů bylo uvolněné množství po měsíční inkubační době menší než po týdenní inkubaci. Tato situace je nejspíše způsobená rychlým uvolněním enkapsulovaných látek během uchovávání a jejich následnou degradací.

K testování dlouhodobé stability byly použity liposomy ve vodném a etanolovém prostředí připravené metodou 1, vzhledem k jejich možné aplikaci do modelových potravin. Nejvíce stabilní byly liposomy v modelové potravíně č. 1. Tato modelová potravina reprezentuje skupinu reálných potravin, jejichž základní bází je voda. Stabilní byly také liposomy v etanolovém a kyselém prostředí. Nejméně stabilní byly liposomy aplikované do tučné modelové potraviny. Zde docházelo k rychlému rozpadu liposomů a následnému znehodnocení enkapsulovaných aktivních látek. Na základě zjištěné stability liposomů v modelových podmínkách, je možné tyto liposomy aplikovat i do potravin reálných. Veškeré určené hodnoty dlouhodobé stability jsou zaznamenány v Tabulce 11.

6 Závěr

Tato práce je zaměřena na přípravu a aplikaci enkapsulovaných aktivních látek kopřivy, rozmarýnu, šalvěje, černého bezu, levandule, heřmánku, hřebíčku a lysozymu.

V teoretické části jsou charakterizovány přírodní látky vykazující antimikrobiální a antioxidační charakter, jako jsou polyfenoly, flavonoidy a lysozym. Dále jsou v teoretické části uvedeny metody přípravy a možnosti charakterizace liposomů, dále metody, kterými lze určit antimikrobiální účinky a stručná charakteristika vybraných testovaných kmenů bakterií.

V experimentální části byly stanoveny základní chemické charakteristiky jednotlivých bylinek a připravené extrakty byly následně enkapsulovány do liposomů. Byla stanovena jejich enkapsulační účinnost a stabilita připravených částic v podmínkách simulujících trávicí soustavu a v modelových potravinách.

Při charakterizaci bylinek bylo určeno celkové množství polyfenolů vyextrahovaných ve vodném prostředí, v prostředí 5 % kyseliny citronové a v prostředí 20 % etanolu. Nejvyšší obsah polyfenolů byl v etanolvém extraktu hřebíčku - 91,729 mg/g. Dále byl sledován celkový obsah flavonoidů. Nejvíce flavonoidů bylo obsaženo v extraktu černého bezu, a to 32,382 mg/g. U bylinných extraktů byl též stanoven antioxidační účinek v různých prostředích pomocí ABTS⁺ činidla. Nejúčinnější antioxidační efekt vykazoval extrakt hřebíčku ve vodě - 46,686 mg/g. Naopak nejnižší obsah polyfenolů a flavonoidů byl stanoven v extraktu heřmánku, jenž také vykazoval nejnižší antioxidační aktivitu.

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byla vybrána bujónová diluční metoda a agarová difúzní metoda. Byly testovány antimikrobiální účinky lysozymu o různých koncentracích, a také jednotlivé extrakty bylinek. Na základě antimikrobiální účinnosti bylinných extraktů byly vybrány nejvhodnější bylinky, jejichž aktivní látky byly enkapsulovány a testovány na antimikrobiální aktivitu i ve formě liposomů. Největší antimikrobiální účinek vykazoval hřebíček, jak ve formě extraktu, tak i enkapsulovaný v liposomech. Významnou antimikrobiální aktivitu vykazovaly také extrakty heřmánku, šalvěje a kopřivy. Roztok lysozymu antimikrobiálně působil na všechny vybrané kmeny mikroorganismů, viditelně vyšší antimikrobiální účinek lysozymu byl však pozorován u gramnegativních bakterií. Naopak účinky bylinných látek vykazovaly nejvyšší účinek u grampozitivních bakterií. Kombinací enkapsulovaných bylinných extraktů a lysozymu lze tedy dosáhnout maximálního a dlouhodobého účinku proti širokému spektru bakterií.

Metodou dynamického rozptylu světla byla dále charakterizována velikost a stabilita připravených částic. Průměrné hodnoty velikostí částic se pohybovaly v rozmezí od 167 nm do 281 nm. Všechny připravené částice byly stabilní. Nejstabilnější byly částice s obsahem hřebíčku - 44,93 mV, nejméně stabilní byly prázdné liposomy. Vlivem enkapsulace aktivních látek došlo tedy u všech připravených částic ke zvýšení jejich stability a rovněž ke zvýšení velikosti. Jedinou výjimkou byl hřebíček, jehož částice byly menší (121 nm) než prázdné liposomy (167 nm).

Při stanovení stability v modelovém prostředí simulujícím trávicí soustavu byly použity částice připravené pomocí ultrazvuku. Tato metoda byla vybrána z důvodu aplikace do potravin. V žaludeční šťávě se největší množství aktivních látek uvolnilo z částic kopřivy

a hřebíčku, ale jejich koncentrace nepřesáhla $0,06 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. V pankreatické a žlučové šťávě se uvolnilo největší množství látek z částic s obsahem hřebíčku.

Liposomy aplikované do modelových potravin byly nejstabilnější ve skupině, charakterizující potraviny na bázi vody. Nejméně stabilní prostředí pro liposomy byla modelová potravina typu olejové emulze. Nejstabilnější částice v modelových potravinách byly částice s enkapsulovaným černým bezem a hřebíčkem. Částice s enkapsulovaným lysozymem se chovaly nejstabilněji v modelové kyselé potravine.

Na základě zjištěných aktivních charakteristik, enkapsulačních vlastností a stability bylinných extraktů by mohly být tyto částice v potravinářství aplikovány například do nápojů nebo sirupů a v koncentrovanější formě by se mohly využít jako kapky ve formě potravinového doplňku. Díky antimikrobiálním a antioxidačním účinkům by se pak tyto kapky mohly použít k detoxikaci organismu po dlouhodobém onemocnění. Možné je také použití těchto částic v kosmetickém průmyslu.

7 Seznam použitých zdrojů

- [1] VALENTOVÁ, Eva. Co jsou antioxidanty?. [online]. [cit. 2014-12-27]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/co-jsou-to-antioxidanty>
- [2] Stabilita suspenzí a disperzí: proč jsou parametry jako velikost částic, zeta potenciál a reologické vlastnosti tak důležité. In: *CHEMagazín*. 2011, s. 14-16. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_4_cl3.pdf
- [3] BANKS, J. G.; BOARD, Ronald George; SPARKS, N. H. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. *Biotechnology and applied biochemistry*, 1985, 8.2-3: 103-147
- [4] KLEYWEGT, Gerard. Structural Biology Labs, Uppsala. [online]. [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: <http://xray.bmc.uu.se/>
- [5] DR. BIEG, Sabine a Prof. Dr. Alfred MAELICKE. Lysozyme. In: [online]. [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biokatalyse_enzyme/lysozym.vlu.html
- [6] SCHINDLER, Melvin, et al. Mechanism of lysozyme catalysis: role of ground-state strain in subsite D in hen egg-white and human lysozymes. *Biochemistry*, 1977, 16.3: 423-431.
- [7] ZLOCH, Z.; ČELAKOVSKÝ, J.; AUJEZDSKÁ, A. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. *Závěrečná zpráva o plnění výzkumného projektu podpořeného finančně Nadačním fondem Institutu*, 2004.
- [8] BRAVO, Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 1998, 56.11: 317-333.
- [9] MIDDLETON, Elliott; KANDASWAMI, Chithan; THEOHARIDES, Theoharis C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 2000, 52.4: 673-751.
- [10] MAREČEK, František. *Zahradnický slovník naučný. 3 ; CH-M*. 1. vyd. Praha: ÚZPI, 1997, 559 s. : il. ISBN 80-85120-62-3.
- [11] MAREČEK, František. *Zahradnický slovník naučný. 5 ; R-Ž / František Mareček ... [et al.]*. 1. vyd. Praha: ÚZPI, 2001, 674 s. : il. ISBN 80-7271-075-3.
- [12] *Herbář Wendys* [online]. [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/>
- [13] MRÁKOTOVÁ, Alena. *Hřebíček: nejen jako prevence zubního kazu*. In: [online]. 2010, 17. květen [cit. 2015-04-26]. Dostupné z: <http://bylinky.zdrave.cz/hrebicek-nejen-jako-prevence-zubniho-kazu/>
- [14] BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94.3: 223-253.

- [15] POKLUDOVÁ, Lucie. Základy problematiky terapie antibiotiky. Studijní text Masarykovy Univerzity v Brně
- [16] KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 2003, 10.10: 813-829.
- [17] BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renata KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. 80 s. ISBN 978-80-7305-676-6.
- [18] PAULI, A.; SCHILCHER, H. In vitro antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopoeia. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*, 2010, 353-547.
- [19] BASER, K. Husnu Can; BUCHBAUER, Gerhard (ed.). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press, 2009.
- [20] NEGI, Pradeep Singh. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International journal of food microbiology*, 2012, 156.1: 7-17.
- [21] VON STASZEWSKI, Mariana; PILOSO, Ana MR; JAGUS, Rosa J. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, 2011, 125.1: 186-192.
- [22] SOLÓRZANO-SANTOS, Fortino; MIRANDA-NOVALES, Maria Guadalupe. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 2012, 23.2: 136-141.
- [23] LEVI, Steva, RAC, Vladislav, MANOJLOVI, Verica, RAKI, Vesna, BUGARSKI, Branko, FLOCK, Teresa, KRZYCZMONIK, Katarzyna Ewa, NEDOVI, Viktor. *Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol)*. *Procedia Food Science* [online]. 2011, vol. 1, s. 1816-1820 [cit. 2015-04-23]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.266.
- [24] BASU, Subhash C, BASU, Manju. *Liposome methods and protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, c2002, xi, 249 p. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 199. ISBN 0896038459.
- [25] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004, 171 s. ISBN 80-7080-551-x.
- [26] TESTER, Chantel C. a Derk JOESTER. Precipitation in Liposomes as a Model for Intracellular Biomineralization. [online]. s. 257 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/B978-0-12-416617-2.00012-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166172000126>
- [27] PANČÍK, Peter. Biopedia.sk. [online]. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z: <http://www.biopedia.sk/>

- [28] RICKWOOD, D., HAMES, B. D. *Liposomes a practical approach*. IRL-Press Oxford, 1990. pp. 420. ISBN 978-0-19-963654-9.
- [29] LASIC, D. D. *Liposomes in gene delivery*. CRC-Press, 1997. 320 p. Boca Raton. New York. ISBN 978-0849331091.
- [30] MUJUMDAR, Arun S. *Handbook of industrial drying*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, c2007, 1280 p. ISBN 9781420017618.
- [31] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 1. vyd. Ostrava: P. Klouda, 2000, 155 s. ISBN 80-86369-00-5.
- [32] BŘÍŽDALA, Jan. *E-CHemBook: multimediální učebnice chemie*. [online]. [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: <http://www.e-chembook.eu/cs/>
- [33] VELÍŠEK, Jan. *Chemie Potravín 3. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 368 s.* ISBN 80-86659-02-X.
- [34] *Socratic* [online]. 2015, 9. leden [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://socratic.org/questions/which-does-not-contain-glycerol-a-phosphatidic-acid-b-phosphatidylserine-c-lectith>
- [35] *Optické vlastnosti koloidních soustav: fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu. Krystalografická společnost* [online]. 2008 [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>
- [36] Distribuce velikosti částic a koloidní stabilita [online]. [cit. 2015-04-23]. Dostupné z WWW: http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/LOTP/LOTP_09_emulse.pdf
- [37] KVÍTEK, Libor a PANÁČEK, Aleš. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 70 s. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [38] Kultivace bakterií: Půdy, podmínky a metody. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO. Fakulta veterinárního lékařství: Mikrobiologie pro farmaceuty [online]. 2006 [cit. 2012-04-25].
- [39] JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 404 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-1270-4.
- [40] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
- [41] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [42] VOTAVA, Miroslav, Zdeněk BROUKAL a Jiří VANĚK. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Brno: Neptun, c2007, xxv, 567 s. ISBN 978-808-6850-030.
- [43] VOET, Donald. *Biochemie*. 1. vyd. Praha: VICTORIA PUBLISHING, 1995, 1325 s. ISBN 80-856-0544-9.

- [44] TVRZOVÁ, Ludmila, CHUMCHALOVÁ, Jana, NĚMEC, Miroslav, PÁČOVÁ, Zdenka, SAVICKÁ, Dana, KUBÁTOVÁ, Alena, PATÁKOVÁ, Petra. *Miniatlas mikroorganismů* [online]. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2006 [cit 2015-04-23]. Elport8l.
Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/?id=702650>. ISSN 1802-128X
- [45] LEE, Sang Yup. *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*. Dordrecht: Springer, c2009, xxi, 462 p. ISBN 14-020-9394-2.
- [46] HEJAZI, A., F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1997, vol. 46, issue 11, s. 903-912 [cit. 2015-04-08]. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903.
- [47] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [48] LIU J, Kwon YH. *Seton Infection: Serratia Marcescens: 57-year-old white female with 1 day history of redness, swelling, and pain in her right eye*. EyeRounds.org. March 5, 2005; Dostupné z: <http://www.EyeRounds.org/cases/34-setoninfection.htm>.
- [49] HIGGINS, Douglas, DWORKIN, Jonathan. *Recent progress in Bacillus subtilis sporulation*. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2011, vol. 36, issue 1, s. 131-148 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x.
- [50] *Bacillus subtilis Final Risk Assessment*. *United States Environmental Protection Agency* [online]. 1997, 2012 [cit. 2015-04-25].
Dostupné z: http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm
- [51] Microbe World. WISTREICH. [online]. 2012, July 12 [cit. 2015-04-05].
Dostupné z: <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=9078>
- [52] MÁROVÁ, Ivana. VUT V BRNĚ. *Praktikum z biochemie*. 2. vyd. Brno: VUTIUM, 2012.
- [53] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*. In: *Chemické listy*. 2004, s. 174-179.
Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf